

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

97 EP 0 869 167 B 1

10 DE 697 16 711 T 2

51 Int. Cl. 7:  
C 11 B 3/00

C 12 N 15/55  
C 12 N 9/20  
C 12 N 15/80  
C 12 N 1/15  
C 12 N 1/21  
C 13 K 1/08  
C 13 D 3/00  
A 21 D 8/04  
A 23 K 1/165

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 697 16 711.9  
98 Europäisches Aktenzeichen: 97 610 056.0  
95 Europäischer Anmeldetag: 9. 12. 1997  
97 Erstveröffentlichung durch das EPA: 7. 10. 1998  
97 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 30. 10. 2002  
47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 18. 9. 2003

DE 697 16 711 T 2

30 Unionspriorität:

140896	09. 12. 1996	DK
143296	16. 12. 1996	DK
19097	21. 02. 1997	DK
21197	26. 02. 1997	DK
128397	11. 11. 1997	DK

73 Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

74 Vertreter:

Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,  
Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

84 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
NL, PT, SE

77 Erfinder:

Clausen, Ib Groth, 2880 Bagsvaerd, DK; Patkar,  
Shamkant Anant, 2880 Bagsvaerd, DK; Borch, Kim,  
2880 Bagsvaerd, DK; Halkier, Torben, 3460 Birkerød,  
DK; Barfoed, Martin, Raleigh, US; Clausen, Kim,  
2880 Bagsvaerd, DK; Fuglsang, Claus Crone, 2880  
Bagsvaerd, DK; Dybdal, Lone, 2880 Bagsvaerd, DK

- 54 Verringerung von phosphorhaltigen Substanzen in Speiseölen mit hohem Anteil an nicht-hydratisierbarem Phosphor unter Verwendung einer Phospholipase, eine Phospholipase aus fadenförmigen Pilz, welche eine Phospholipase A und/oder B-Aktivität aufweist

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 697 16 711 T 2

BEST AVAILABLE COPY

Früher charakterisierte Pilz-PLA- und/oder PLB-Enzyme:

Zahlreiche Literaturstellen beschreiben die Charakterisierung von Pilz-Phospholipasen. Um es leichter zu machen, einen Überblick des Standes der Technik zu erhalten, wurden die Literaturstellen auf zwei Abschnitte aufgeteilt.

Abschnitt 1 befaßt sich mit Referenzen, welche die Identifizierung von Pilz-Phospholipasen beschreiben, von denen derzeit nicht angenommen wird, daß sie mit der Pilz-Phospholipase der vorliegenden Erfindung verwandt sind. Diese Literaturstellen sind hauptsächlich eingeschlossen, um den Stand der Technik auf dem Gebiet der Charakterisierung von Pilz-Phospholipasen zusammenzufassen.

Abschnitt 2 behandelt Literaturstellen, welche die Charakterisierung von Pilz-Phospholipasen beschreiben, von denen angenommen wird, daß sie eine gewisse Relevanz für die Pilz-Phospholipasen der vorliegenden Erfindung besitzen.

Abschnitt 1:

Enzyme mit Phospholipase A- und/oder B-Aktivität wurden in verschiedenen Pilzquellen gefunden, einschließlich *Penicillium notatum* (auch bekannt als *P. chrysogenum*; N. Kawasaki, J. Biochem., 77, 1233-44, 1975; N. Masuda et al., Eur. J. Biochem., 202, 783-787, 1991), *P. cyclopium* (Process Biochemistry 30(5): 393-401 (1995)), *Saccharomyces cerevisiae* (M. Ichimasa et al., Agric. Biol. Chem., 49(4), 1083-89, 1985; F. Paultauf et al., J. Biol. Chem., 269, 19725-30, 1994), *Torulaspora delbrueckii* (alter Name *Saccharomyces rosei*; Y. Kuwabara, Agric. Biol. Chem., 52(10), 2451-58, 1988; FEMS, Microbiol. Letters, 124, 29-34), *Schizosaccharomyces pombe* (H. Oishi et al., Biosci. Biotech. Biochem., 60(7), 1087-92, 1996), *Aspergillus niger* (Technical Bulletin, G-zyme™ G999, Enzyme Bio-Systems Ltd.; Process Biochemistry 30(5): 393-401 (1995)) und

*Corticium centrifugum* (S. Uehara et al., Agric. Biol. Chem., 43(3), 517-525, 1979).

Abschnitt 2:

5

EP 575 133 A2 beschreibt die Isolierung und Charakterisierung einer aus *Aspergillus* erhaltenen Pilz-Phospholipase A1 und deren Verwendung für industrielle Anwendungen.

- 10 In der Anmeldung ist weder eine Sequenzinformation (weder DNA noch Aminosäure) noch irgendeine Strategie oder ein Vorschlag zur Klonierung irgendeiner der in der Anmeldung erörterten oder genannten *Aspergillus*-Phospholipasen offenbart.

- 15 Tsung-Che et al. (Phytopathological notes 58:1437-38 (1968)) beschreiben kurz die Charakterisierung einer Phospholipase aus *Fusarium solani*.

- EP 130 064 beschreibt eine isolierte Fraktion einer Fermentationsbouillon, die Lipase-Aktivität aufweist, erhalten aus dem Stamm *Fusarium oxysporum*, DSM  
20 2672. Ferner wird deren Verwendung in Detergens-Zusammensetzungen offenbart. Jedoch beschreibt EP 130 064 diese Fraktion nicht als irgendeine Phospholipase-Aktivität aufweisend.

- WO 96/13579 beschreibt eine Lipase, die aus dem Stamm *Fusarium culmorum*,  
25 CBS 513.94, erhalten wurde, einschließlich ihrer N-terminalen Sequenz.

Jedoch beschreibt WO 96/13579 keinerlei Enzym, das Phospholipase-Aktivität aufweist.

5 Eine cDNA-Sequenz, die für eine Lipase aus *Fusarium heterosporum* kodiert, ist beschrieben (Klonierung und Nukleotidsequenz von cDNA, die für eine Lipase aus *Fusarium heterosporum* kodiert, J. Biochem. 116, 536-540, 1994). Von dieser Sequenz wird derzeit angenommen, daß sie im Vergleich mit einer klonierten DNA-Sequenz der Erfindung die am engsten verwandte DNA-Sequenz ist (siehe Abschnitt "Vergleich mit dem Stand der Technik" (siehe unten)). Diese Referenz  
10 beschreibt jedoch keinerlei Enzym, das eine Phospholipase-Aktivität aufweist.

Eine cDNA-Sequenz, die für eine Phospholipase B aus *Penicillium notatum* kodiert, ist beschrieben (Eur. J. Biochem 202:783-787, 1991). Jedoch hat diese klonierte DNA-Sequenz eine sehr beschränkte Homologie zu einer DNA-Sequenz  
15 der Erfindung (siehe Abschnitt "Vergleich mit dem Stand der Technik" (siehe unten)).

#### Industrielle Verwendung von Phospholipasen:

20 Eine Reihe von Verwendungen von Phospholipasen sind im Stand der Technik bekannt, wie die Verwendung von Phospholipase bei z.B. der enzymatischen Degummierung eines mit Wasser degummierten Öls (US 5,264,367, Metallgesellschaft, Röhlm), Behandlung eines Stärkehydrolysats (insbesondere aus Weizenstärke) zur Verbesserung der Filtrierbarkeit (EP 219 269, CPC International), als  
25 Additiv zu Brotteig, um die Elastizität des Brotes zu verbessern, (US 4,567,046, Kyowa Hakko) und zur Herstellung von Lysolecithin mit speziellen Emulgier Eigenschaften.

Derzeit wird die Phospholipase Lecitase® (Novo Nordisk A/S) kommerziell z.B. zur Degummierung von Ölen eingesetzt. Lecitase® ist ein Säugerenzym, das aus Schweinepankreas erhalten wird.

- 5 Es ist wohl bekannt, daß es möglich ist, Pilzenzyme in industriell wirtschaftlich annehmbaren Ausbeuten rekombinant herzustellen, insbesondere aus Fadenpilzen.

Folglich ist es eine Aufgabe dieser Erfindung, eine verbesserte Phospholipase, z.B. zur Verwendung in den oben beschriebenen Verfahren, bereitzustellen.

10

Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren und Methoden zur rekombinanten Herstellung einer aus einem Fadenpilz erhaltenen Phospholipase in industriell annehmbaren Ausbeuten zu beschreiben.

15

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

- Die Degummierung von Speiseölen mit Wasser erfolgt durch Extraktion mit Wasser. Bei dieser Behandlung wird ein Teil der Phosphatide im Öl zurückgelassen. Dieser Anteil wird durch den generischen Begriff "nicht-hydratisierbare Phosphatide" (NHP) beschrieben. Bei der Herstellung von Ölen ist es essentiell, den NHP-Gehalt zu entfernen (US 5,264,367).
- 20

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit, um den NHP-Gehalt in einem Öl zu entfernen, das einen relativ hohen Gehalt an NHP enthält.

25

Dementsprechend betrifft die Erfindung in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Verringerung des Gehalts an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl,

das einen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor von mindestens 50 ppm aufweist, gemessen durch

- 5 i) Vorbehandeln des Speiseöls bei 60° C durch Zugabe einer Lösung, die Citronensäure-Monohydrat in Wasser umfaßt (das zugesetzte Wasser, bezogen auf das Öl, entspricht 4,8 % Gew./Gew.; [Citronensäure] in der Wasserphase = 106 mM, in der Wasser/Öl-Emulsion = 4,6 mM), für 30 Minuten;
- 10 ii) Überführen von 10 ml der vorbehandelten Wasser-in-Öl-Emulsion in ein Röhrchen;
- iii) Erwärmen der Emulsion in einem siedenden Wasserbad für 30 Minuten;
- iv) Zentrifugieren bei 5000 UpM für 10 Minuten;
- v) Überführen von etwa 8 ml der oberen (Öl-)Phase in ein neues Röhrchen und 24 Stunden lang zum Absetzen stehenlassen; und
- 15 vi) danach Entnehmen von 2 g der oberen klaren Phase zur Bestimmung des Gehalts an nicht-hydrisierbarem Phosphor (ppm) in dem Speiseöl;

20 und wobei das Verfahren umfaßt, daß das Öl bei einem pH-Wert von 1,5-8 mit einer wäßrigen Lösung einer Phospholipase A<sub>1</sub>, einer Phospholipase A<sub>2</sub> oder einer Phospholipase B kontaktiert wird, wobei die Lösung in dem Öl emulgiert wird, bis der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 11 ppm reduziert ist, und anschließend die wäßrige Phase von dem behandelten Öl abgetrennt wird.

25 In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine neue klonierte Phospholipase.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Natur der Lipase-Aktivität, die in *Fusarium oxysporum*, DSM 2672, gefunden wird (und in EP 130 064 beschrieben ist),

offenbaren, daß die isolierte Fraktion mehrere Komponenten mit Lipase-Aktivität umfaßt, von denen eine Phospholipase-Aktivität aufwies.

5 Trotz einer Reihe technischer Schwierigkeiten (siehe unten) waren die vorliegenden Erfinder in der Lage, ein Enzym, das Phospholipase A-Aktivität aufweist, aus einem Stamm der Gattung *Fusarium*, spezieller *Fusarium oxysporum*, zu klonieren.

10 Dies ist das erste Mal, daß eine Fadenpilz-Phospholipase A kloniert wurde, und folglich stellt die vorliegende Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz bereit, die für ein Fadenpilz-Phospholipase A-Enzym kodiert.

Dementsprechend betrifft ein Aspekt der Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid mit Phospholipase A-Aktivität kodiert, wobei die DNA-  
15 Sequenz aus einem Fadenpilz erhalten wird.

Eine cDNA-Sequenz, die für eine Phospholipase B aus *Penicillium notatum* kodiert, wird in Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991, beschrieben.

20 Diese DNA-Sequenz zeigt jedoch nur eine sehr begrenzte DNA-Identität von 39 % mit der DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung (SEQ-ID-Nr. 1, 23-1060) und darüber hinaus variiert ein physiologisches charakteristisches Merkmal wie die Molekülmasse beträchtlich zwischen der PLB aus *P. notatum* (66 kD) und einer Phospholipase der Erfindung ( $29 \pm 10$  kD (siehe unten)).

25

Ferner hat ein Vergleich mit Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Standes der Technik gezeigt, daß die DNA-Sequenz und/oder die entsprechende kodierte

Aminosäuresequenz der Erfindung nur wenig Homologie zu irgendwelchen DNA- und/oder Aminosäuresequenzen des Standes der Technik aufweist (siehe unten).

5 Folglich wird derzeit angenommen, daß die in der vorliegenden Anmeldung bereitgestellte DNA-Sequenzinformation sehr wertvoll sein wird, um beispielsweise eine andere, für eine verwandte/homologe Phospholipase kodierende DNA-Sequenz zu klonieren, da eine spezifische Hybridisierungssonde und/oder PCR-Primer nun unschwer auf Grundlage dieser DNA-Sequenz der Erfindung konstruiert werden können.

10 Ferner wird derzeit davon ausgegangen, daß es möglich ist, auf Grundlage der in der vorliegenden Anmeldung bereitgestellten Sequenzinformation eine DNA-Sequenz zu klonieren, die für eine verwandte/homologe Phospholipase A und/oder auch für eine Phospholipase B kodiert.

15 Dementsprechend betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt eine klonierte DNA-Sequenz, kodierend für ein Enzym, das Phospholipase A- und/oder Phospholipase B-Aktivität aufweist, wobei die DNA-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend:

- 20
- (a) den für Phospholipase A kodierenden Abschnitt der DNA-Sequenz, welche in das Plasmid pYES 2.0 kloniert ist, das in *Escherichia coli* DSM 11299 vorliegt;
  - (b) die DNA-Sequenz, die in den Positionen 23-1063 in SEQ-ID-Nr. 1, bevorzugter in den Positionen 113-1063 in SEQ-ID-Nr. 1 oder noch bevorzugter  
25 in den Positionen 113-929 in SEQ-ID-Nr. 1, dargestellt ist, oder deren komplementärer Strang;
  - (c) eine DNA-Sequenz, die mindestens zu 70 % homolog zu den in (a) oder (b) definierten DNA-Sequenzen ist;



- (d) eine in (a) oder (b) definierte DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert, welches Phospholipase-Aktivität aufweist und mindestens zu 70 % homolog zu der Polypeptidsequenz ist, die in den Positionen 31-346 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt ist, oder bevorzugter mindestens zu 70 % homolog zu der Polypeptidsequenz ist, die in den Positionen 31-303 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt ist;
- (e) eine DNA-Sequenz, die mit einer doppelsträngigen DNA-Sonde, welche die in den Positionen 23-1063 in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellte DNA-Sequenz umfaßt, bei niedriger Stringenz hybridisiert;
- (f) eine DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid mit denselben Aminosäuresequenzen wie die Reste der Positionen 1 bis 346, 31 bis 346 oder 31 bis 303 von SEQ-ID-Nr. 2 oder den Aminosäuresequenzen, die von irgendeiner der DNA-Sequenzen von (e) kodiert werden, kodiert; und
- (g) eine DNA-Sequenz, die ein Fragment der in (a), (b), (c), (d), (e) oder (f) angegebenen DNA-Sequenzen ist.

Ferner wurde eine Phospholipase der Erfindung eingehend charakterisiert und es wurde festgestellt, daß sie eine Phospholipase-Aktivität bei niedrigem pH-Wert aufweist; diese Eigenschaft macht sie sehr geeignet zur Verwendung bei der Öldegummierung. Die Phospholipase ist nicht membrangebunden, was sie für die kommerzielle Produktion und Aufreinigung geeignet macht.

Dementsprechend betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-A-Aktivität, welches Polypeptid von einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten wird und

- i) PLA-Aktivität im pH-Bereich 3-10, gemessen bei 40° C,
- ii) eine Molekülmasse von  $29 \pm 10$  kD, wie bestimmt durch SDS-PAGE,
- iii) einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich von 4,5-8,

- iv) ein Temperaturoptimum für Phospholipase-Aktivität im Bereich zwischen 25-55° C, gemessen mit Lecithin als Substrat bei pH 5, und/oder
- v) ein pH-Optimum für Phospholipase-Aktivität im pH-Bereich zwischen 6-12, gemessen mit Lecithin als Substrat bei 37° C, aufweist.

Eine abgeleitete Aminosäuresequenz einer isolierten Phospholipase der Erfindung ist in SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt.

- 10 Die N-terminale Aminosäuresequenz einer reifen sekretierten isolierten Phospholipase wurde bestimmt. Diese N-terminale Sequenz zeigte, daß der reife Anteil einer Phospholipase der Erfindung, welche die in SEQ-ID-Nr. 2 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, bei Aminosäure Nr. 31 in SEQ-ID-Nr. 2 beginnt. Siehe das hier vorliegende Arbeitsbeispiel hinsichtlich weiterer Details (siehe unten).

15

- Ferner wurde die C-terminale Sequenz einer aktiven sekretierten Phospholipase der Erfindung mit der in SEQ-ID-Nr. 2 dargestellten Aminosäuresequenz bestimmt. Diese C-terminal bestimmte Phospholipase wurde in dem Fadenpilz-Stamm *Aspergillus oryzae* rekombinant exprimiert. Siehe das hier vorliegende
- 20 Arbeitsbeispiel hinsichtlich einer weiteren Bezugnahme.

- Diese Ergebnisse zeigten, daß das Enzym während der Expression von *A. oryzae* C-terminal prozessiert wurde, und die Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Ser303 in SEQ-ID-Nr. 2 der wahrscheinlichste C-terminale Rest in dem expri-
- 25 mierten reifen aktiven Enzym ist. Voraussichtlich kann jedoch eine noch weitere C-terminale Prozessierung stattfinden (d.h., ein Fragment dieser Sequenzen ergeben) und immer noch ein exprimiertes reifes aktives Enzym vorliegen.

Dementsprechend betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt ein isoliertes Enzym, das Phospholipase A- und/oder B-Aktivität aufweist und ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend:

- 5 (a) ein Polypeptid, das von dem für das Enzym Phospholipase A und/oder B kodierenden Abschnitt der DNA-Sequenz kodiert wird, welche in das Plasmid pYES 2.0 kloniert ist, das in *Escherichia coli* DSM 11299 vorliegt;
- (b) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz wie in den Positionen 31-346  
10 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt;
- (c) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz wie in Position 31-303 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt;
- (d) ein Analogon des in (a), (b) oder (c) definierten Polypeptids, welches Analogon mindestens zu 70 % homolog zu dem Polypeptid ist; und
- 15 (e) ein Fragment von (a), (b), (c) oder (d).

In einem noch weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, welcher die heterologe rekombinante Herstellung eines Enzyms der Erfindung ermöglicht. Dadurch ist es möglich, eine hochgereinigte  
20 Phospholipase-Zusammensetzung herzustellen, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie frei von homologen Verunreinigungen ist. Dies ist für eine Reihe industrieller Anwendungen sehr vorteilhaft.

Die vorliegende Erfindung demonstriert experimentell (siehe unten), daß eine  
25 Phospholipase, die sowohl aus einem Stamm von *Fusarium culmorum* als auch *Fusarium oxysporum* erhalten wurde, verbesserte Eigenschaften zur Verwendung in industriell relevanten Anwendungen besitzt. Voraussichtlich werden Phospholipasen, die aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten werden, verbesserte Eigenschaften von Bedeutung für die Verwendung in industriell relevanten An-  
30 wendungen besitzen.

Dementsprechend betrifft die Erfindung in einem noch weiteren Aspekt die Verwendung einer Phospholipase, die aus einem Stamm der Gattung *Fusarium*, z.B. einem Stamm von *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* oder insbesondere  
5 einem Stamm von *Fusarium oxysporum*, erhalten wurde, in einem Verfahren, das die Behandlung eines Phospholipids oder Lysophospholipids mit der Phospholipase zur Hydrolyse von Fett-Acylgruppen umfaßt.

Schließlich betrifft die Erfindung eine isolierte, im wesentlichen reine biologische  
10 Kultur des *Escherichia coli*-Stammes DSM Nr. 11299, der eine für Phospholipase kodierende DNA-Sequenz (den für Phospholipase kodierenden Abschnitt der DNA-Sequenz, welche in das Plasmid pYES 2.0 kloniert ist, das in *Escherichia coli* DSM 11299 vorliegt) beherbergt, die aus einem Stamm des Fadenpilzes *Fusarium oxysporum* erhalten wurde, oder irgendeiner Mutante des *E. coli*-Stammes,  
15 welche das Vermögen zur Kodierung für Phospholipase behalten hat.

#### Sequenzhomologie-Vergleich mit dem Stand der Technik

Es wurde eine Homologiesuche mit der Phospholipase der Erfindung gegen Nukleotid- und Protein-Datenbanken durchgeführt. Die Homologiesuche zeigte, daß  
20 die am engsten verwandte bekannte Sequenz eine Lipase aus *Fusarium heterosporum* war (eine Aminosäurezuordnung ist in Figur 1 dargestellt).

Die DNA-Sequenz der Erfindung (SEQ-ID-Nr. 1, 23-1060), welche für die Phospholipase kodiert, zeigt nur 62 % DNA-Homologie zu der bekannten Lipase-Sequenz aus *Fusarium heterosporum* (Genbank-Datenbank-Referenz S77816)  
25 und die entsprechende Aminosäuresequenz der Phospholipase der Erfindung

(SEQ-ID-Nr. 2) zeigt nur 60 % Homologie zu einer abgeleiteten Aminosäuresequenz, die auf der obigen bekannten DNA-Sequenz basiert (siehe Figur 1).

5 Dies zeigt, daß die DNA- und/oder die Aminosäuresequenz einer Phospholipase der Erfindung sich in der Tat von jeder bekannten DNA- und/oder Aminosäuresequenz unterscheidet.

Eine cDNA-Sequenz, kodierend für eine Phospholipase B aus *Penicillium notatum*, ist beschrieben (Eur. J. Biochem 202:783-787, 1991). Jedoch zeigt diese  
10 DNA-Sequenz (Genbank-Datenbank-Referenz X60348) nur eine sehr beschränkte DNA-Identität von 39 % mit der DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung (SEQ-ID-Nr. 1, 23-1060) und die entsprechende Aminosäuresequenz der Phospholipase der Erfindung (SEQ-ID-Nr. 2) zeigt nur 20 % Identität mit einer abgeleiteten Aminosäuresequenz, die auf der obigen bekannten PLB-DNA-Sequenz  
15 basiert.

Die Berechnung der Homologie erfolgte wie in dieser Patentbeschreibung später beschrieben.

20 **Zeichnungen:**

**Figur 1:** Zuordnung der in SEQ-ID-Nr. 2 dargestellten Aminosäuresequenz zu einer Lipase-Sequenz des Standes der Technik aus *Fusarium heterosporum*

**Figur 2:** Vergleich des enzymatischen Degummierungsvermögens von Lecitase<sup>TM</sup> und einer erfindungsgemäßen Phospholipase aus *Fusarium oxysporum*  
25

### Definitionen

Vor der detaillierteren Erörterung dieser Erfindung sollen die folgenden Begriffe definiert werden.

5

"Eine klonierte DNA-Sequenz": Der Begriff "eine klonierte DNA-Sequenz" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, welche nach Standardklonierungsverfahren kloniert wurde, die in der Gentechnik eingesetzt werden, um ein DNA-Segment von seiner natürlichen Position an eine andere Stelle zu bringen, wo es reproduziert werden wird. Der Klonierungsprozeß beinhaltet das Ausschneiden und die Isolierung des gewünschten DNA-Segments, die Insertion des DNA-Stücks in das Vektormolekül und Inkorporation des rekombinanten Vektors in eine Zelle, wo mehrfache Kopien oder Klone des DNA-Segments repliziert werden.

15 Die "klonierte DNA-Sequenz" der Erfindung kann alternativ als "DNA-Konstrukt" oder "ein kloniertes Polynukleotid mit einer DNA-Sequenz", "isolierte DNA-Sequenz" bezeichnet werden.

"Erhalten aus": Für den Zweck der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff "erhalten aus", wie hier in Verbindung mit einer speziellen mikrobiellen Quelle verwendet, daß das Enzym und folglich die DNA-Sequenz, welche für das Enzym kodiert, von der speziellen Quelle oder von einer Zelle, in die ein Gen aus der Quelle eingeführt wurde, produziert wird.

25 "Ein isoliertes Polypeptid": Der Begriff "ein isoliertes Polypeptid", wie hier definiert, oder "isolierte Phospholipase", wie bezüglich der Phospholipase der Erfindung verwendet, ist eine Phospholipase oder ein Teil einer Phospholipase, welche(r) im wesentlichen frei von anderen Nicht-Phospholipase-Polypeptiden ist,

z.B. mindestens zu 20 % rein, vorzugsweise mindestens zu 40 % rein, bevorzugter zu 60 % rein, noch bevorzugter zu 80 % rein, am meisten bevorzugt zu 90 % rein, und sogar noch bevorzugter zu 95 % rein, wie durch SDS-PAGE bestimmt.

- 5 Wenn das isolierte Polypeptid mindestens zu 60 % rein ist, kann der Begriff "ein in hohem Grade isoliertes Polypeptid" verwendet werden.

Das "isolierte Polypeptid" kann alternativ als "gereinigtes Polypeptid" bezeichnet werden.

10

- "Homologe Verunreinigungen": Wie hier verwendet, bedeutet der Begriff "homologe Verunreinigungen" jegliche Verunreinigung (z.B. ein anderes Polypeptid als das Enzym der Erfindung), welche von der homologen Zelle stammt, von der das Enzym der Erfindung ursprünglich erhalten wurde. In der vorliegenden Erfindung kann die homologe Zelle z.B. ein Stamm von *Fusarium oxysporum* sein.
- 15

- "Für Phospholipase kodierender Abschnitt": Wie hier verwendet, bedeutet der Begriff "für Phospholipase kodierender Abschnitt", der in Verbindung mit einer DNA-Sequenz gebraucht wird, denjenigen Bereich der DNA-Sequenz, welcher dem Bereich entspricht, der in eine Polypeptidsequenz translatiert wird.
- 20

In der in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz ist es der Bereich zwischen dem ersten "ATG"-Startcodon ("AUG"-Codon in mRNA) und dem folgenden Stopcodon ("TAA", "TAG" oder "TGA").

25

Das translatierte Polypeptid kann ferner neben der reifen Sequenz, die Phospholipase-Aktivität zeigt, eine N-terminale Signalsequenz und/oder eine Propeptid-

sequenz umfassen. Die Signalsequenz steuert im allgemeinen die Sekretion des Polypeptids und das Propeptid steuert im allgemeinen die Faltung des Polypeptids.

- 5 Hinsichtlich weiterer Informationen siehe Egnell, P., et al., Molecular Microbiol. 6(9):1115-19 (1992), oder Stryer, L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Company/New York, ISBN 0-7167-1920-7.

- 10 "Modifizierung(en) einer DNA- und/oder Aminosäuresequenz": Der Begriff "Modifizierung(en)", in Verbindung mit (einer) Modifizierung(en) einer DNA- und/oder Aminosäuresequenz wie hier erörtert gebraucht, ist so definiert, daß eine chemische Modifizierung ebenso wie (eine) genetische Manipulation(en) eingeschlossen sind. Die Modifizierung(en) kann/können eine Substitution, Deletion und/oder Insertion der oder bei der/den Aminosäure(n) von Interesse sein.

15

"Phospholipase A": Der Begriff "Phospholipase A", der hier in Verbindung mit einem Enzym der Erfindung verwendet wird, soll ein Enzym mit Phospholipase A1- und/oder Phospholipase A2-Aktivität einschließen.

- 20 Phospholipase A1 ist nach der Standard-EC-Enzymklassifizierung als EC 3.1.1.32 definiert.

Offizielle Bezeichnung: Phospholipase A1 (PLA1).

Katalysierte Reaktion:

Phosphatidylcholin + h(2)O < > 2-Acylglycerophosphocholin + ein Fettsäure-Anion

- 25 Anmerkung(en): besitzt eine viel breitere Spezifität als EC 3.1.1.4.

Phospholipase A2 ist gemäß der Standard-EC-Enzymklassifizierung als EC 3.1.1.4 definiert.



Offizielle Bezeichnung: Phospholipase A2 (PLA2)

Alternative Bezeichnung(en): Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase,  
Lecithinase a, Phosphatidase oder Phosphatidolipase

Katalysierte Reaktion:

- 5    Phosphatidylcholin + h(2)O < > 1-Acylglycerophosphocholin + ein            Fett-  
säure-Anion

Anmerkung(en): entfaltet auch Wirkung gegenüber Phosphatidylethanolamin,  
Cholinplasmalogen und Phosphatiden unter Entfernung der mit der 2-Position  
verknüpften Fettsäure

10

"Phospholipase B": Phospholipase B ist gemäß der Standard-EC-Enzym-  
klassifizierung als EC 3.1.1.5 definiert.

Offizielle Bezeichnung: Lysophospholipase

- 15    Alternative Bezeichnung(en): Lecithinase b, Lysolecithinase,  
Phospholipase b, oder plb

Katalysierte Reaktion:

2-Lysophosphatidylcholin + h(2)O < > Glycerophosphocholin + ein Fettsäure-  
Anion

20

- "Phospholipase-Aktivität": Der Begriff "Phospholipase-Aktivität" oder "Phospho-  
lipase-Aktivität aufweisend/zeigend" wie hier in Verbindung mit einem Enzym  
der Erfindung verwendet, soll ein Enzym bezeichnen, welches mindestens denje-  
nigen Grad an Phospholipase-Aktivität (sei es PLA oder PLB) aufweist, wie er im  
25    folgenden experimentell definiert wird.

Dementsprechend ist ein Enzym, welches Phospholipase-Aktivität zeigt, hier als  
ein Enzym definiert, welches in dem "Monoschicht-Phospholipase-Assay", der  
hier in Beispiel 6 dargestellt ist (siehe unten), eine Phospholipase-Aktivität von

- mindestens 0,25 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 0,40 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 0,75 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 1,0 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 1,25 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, und sogar noch bevorzugter mindestens 1,5 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, aufweist.

- Es wird derzeit angenommen, daß nur ein Enzym mit einer solchen signifikanten Phospholipase-Aktivität von industrieller Bedeutung ist, beispielsweise zur Verwendung bei der Degummierung (US 5,264,367).

- "Eine Lipase mit Phospholipase-Nebenaktivität": Der Begriff "Lipase mit Phospholipase-Nebenaktivität" ist dementsprechend definiert als eine Lipase mit einer Phospholipase-Nebenaktivität, wobei die Phospholipase-Nebenaktivität in dem in Beispiel 6 dargestellten "Monoschicht-Phospholipase-Assay" geringer als die obengenannten Zahlen ist.

- Eine Reihe von Lipasen besitzt eine solche Phospholipase-Nebenaktivität. Im hier vorliegenden Arbeitsbeispiel 6 (siehe unten) sind einige der Lipasen mit Phospholipase-Nebenaktivität angegeben.

- "Ein Rohöl": Ein Rohöl (auch als nicht-degummiertes Öl bezeichnet) kann ein gepreßtes oder extrahiertes Öl oder eine Mischung davon, z.B. aus Rapssamen, Sojabohnen oder Sonnenblumen, sein. Der Phosphatidgehalt in einem Rohöl kann von 0,5-3 % Gew./Gew., entsprechend einem Phosphorgehalt im Bereich von 200-1200 ppm, bevorzugter im Bereich von 250-1200 ppm, variieren. Neben den Phosphatiden enthält das Rohöl auch geringe Konzentrationen an Kohlenhydra-

ten, Zuckerverbindungen und Metall/Phosphatidsäure-Komplexen von Ca, Mg und Fe.

5     "Ein halbrohes Öl": Jedes Öl, welches kein Rohöl ist, jedoch einen Phosphatidgehalt von mehr als 250 ppm, bevorzugter mehr als 500 ppm, aufweist. Ein solches Öl könnte beispielsweise erhalten werden, indem ein Rohöl einem ähnlichen Verfahren wie dem im folgenden beschriebenen "mit Wasser degummiertes Öl"-Verfahren unterworfen wird.

10    "Ein mit Wasser degummiertes Öl": Ein mit Wasser degummiertes Öl wird typischerweise durch Mischen von 1-3 % Gew./Gew. heißem Wasser mit warmem (60-90° C) Rohöl erhalten. Gewöhnliche Behandlungszeiträume sind 30-60 Minuten. Der Wasser-Degummierungsschritt entfernt die Phosphatide und schleimigen Gummistoffe, welche in dem Öl unlöslich werden, wenn sie hydratisiert sind.  
15    Die hydratisierten Phosphatide und Gummistoffe können von dem Öl durch Absetzen, Filtrieren oder Zentrifugation abgetrennt werden, wobei Zentrifugation die häufigere Praxis ist.

20    Das wesentliche Ziel bei dem Wasser-Degummierungsverfahren ist die Abtrennung der hydratisierten Phosphatide von dem Öl. Das oben beschriebene Einmischen des heißen Wassers in das Öl sollte hier breit verstanden werden als Einmischen einer wäßrigen Lösung in das Öl gemäß Standardverfahren des Standes der Technik zur Degummierung mit Wasser.

25    Alternativ kann das hier als "ein mit Wasser degummiertes Öl" bezeichnete Verfahren als "Naßraffinerie zur Entfernung von Mucilago" bezeichnet werden (siehe US 5,264,367).

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Ein Verfahren zur enzymatischen Degummierung eines Speiseöls, das einen hohen Gehalt an nicht-hydratisierbaren Phosphatiden/Phospholipiden enthält

Für die vorliegende Erfindung wird der Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor in einem Speiseöl gemessen durch

- 10 i) Vorbehandeln des Speiseöls bei 60° C durch Zugabe einer Lösung, die Citronensäure-Monohydrat in Wasser umfaßt (das zugesetzte Wasser, bezogen auf das Öl, entspricht 4,8 % Gew./Gew.; [Citronensäure] in der Wasserphase = 106 mM, in der Wasser/Öl-Emulsion = 4,6 mM), für 30 Minuten;
- 15 ii) Überführen von 10 ml der vorbehandelten Wasser-in-Öl-Emulsion in ein Röhrchen;
- iii) Erwärmen der Emulsion in einem siedenden Wasserbad für 30 Minuten;
- iv) Zentrifugation bei 5000 UpM für 10 Minuten;
- 20 v) Überführen von etwa 8 ml der oberen (Öl-)Phase in ein neues Röhrchen und 24 Stunden lang (zum Absetzen) stehenlassen;
- vi) nach dem Absetzen Entnahme von 2 g aus der oberen klaren Phase zur Bestimmung des Gehalts an nicht-hydratisierbarem Phosphor (ppm) in dem Speiseöl.

25

Hinsichtlich weiterer Details wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

Wie hier in den Arbeitsbeispielen erläutert, variiert die Phospholipid-Zusammensetzung (hydratisierbares Phospholipid gegenüber nicht-hydratisierbarem Phospholipid) von verschiedenen Speiseölen beträchtlich. Folglich wird das Niveau des verbleibenden Phospholipids in verschiedenen, mit Wasser degummierten Ölen über einen breiten Bereich variieren (z.B. von etwa 30 ppm bis 200 ppm).

Für die enzymatische Degummierung ist die optimale Enzymdosis abhängig von dem Gehalt an nicht-hydratisierbaren Phosphatiden, die nach der Degummierung mit Wasser oder Citronensäure/Wasser-Vorbehandlung wie oben definiert vorliegen.

Ferner ist das enzymatische Degummierungsverfahren um so wirksamer, je höher der Gehalt an nicht-hydratisierbaren Phosphatiden ist, die im Öl vorliegen.

15

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit, um den NHP-Gehalt in Öl zu entfernen, das einen relativ hohen Gehalt an NHP enthält.

Vorzugsweise enthält das Speiseöl einen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor von mindestens 60 ppm, bevorzugter mindestens 100 ppm und noch bevorzugter mindestens 200 ppm.

Bevorzugter enthält das Speiseöl einen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor im Bereich von 60-500 ppm, bevorzugter im Bereich von 100-500 ppm und noch bevorzugter im Bereich von 200-500 ppm.

25

Ein Speiseöl, das gemäß der hier vorliegenden Beschreibung als einen relativ hohen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor aufweisend definiert ist, kann ein mit Wasser degummiertes Öl sein oder bevorzugter ein Rohöl oder ein halbbrohes Öl.

5

Dementsprechend betrifft eine Ausführungsform der Erfindung ein Verfahren gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung, bei dem das Speiseöl ein Rohöl ist, dadurch gekennzeichnet, daß das rohe Speiseöl vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Öl mit einem Phosphorgehalt von mehr als 250  
10 Teilen pro Million (ppm) ist, welches Öl vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht mit Wasser degummiert wurde (Degummierung mit Wasser beinhaltet das Einmischen von heißem Wasser in ein warmes Rohöl, gefolgt von der Entfernung von Phosphatiden, welche in dem Öl unlöslich werden, wenn sie hydratisiert sind).

15

Vorzugsweise hat ein solches rohes Speiseöl vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens einen Phosphorgehalt von mehr als 350 ppm, bevorzugter mehr als 400 ppm, noch bevorzugter mehr als 500 ppm und am meisten bevorzugt mehr als 600 ppm.

20

Ferner hat das rohe Speiseöl vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorzugsweise einen Phosphorgehalt im Bereich von 250-1500 ppm, bevorzugter im Bereich von 350-1500 ppm, noch bevorzugter im Bereich von 500-1500 ppm und am meisten bevorzugt im Bereich von 500-1500 ppm.

25

Das enzymatische Degummierungsverfahren eines rohen Speiseöls gemäß der Erfindung ist gegenüber dem Verfahren des Standes der Technik zur enzymatischen Degummierung eines mit Wasser degummierten Speiseöls (US 5,264,367)

vorteilhaft, da ein direktes enzymatisches Degummierungsverfahren zur Behandlung eines Rohöls gemäß der Erfindung den vorherigen Schritt der Degummierung des Öls mit Wasser ersparen wird.

- 5 Dies spart sowohl Zeit als auch Geld. Ein mit Wasser degummiertes Öl wird typischerweise durch Einmischen von heißem Wasser in warmes (60-90° C) Rohöl für gewöhnlich 30-60 Minuten erhalten. Im Gegensatz dazu kann das gesamte Verfahren der enzymatischen Degummierung von Rohölen gemäß der Erfindung in weniger als einer Stunde durchgeführt werden, mit einer tatsächlichen enzymatischen Behandlung für etwa 25 Minuten. Hinsichtlich weiterer Details siehe das  
10 hier vorliegende Arbeitsbeispiel.

- Ferner kann ein Speiseöl, das gemäß der vorliegenden Beschreibung als einen relativ hohen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor aufweisend definiert ist,  
15 ein halbrohes Öl sein.

- Demgemäß betrifft eine Ausführungsform der Erfindung ein Verfahren gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung, bei dem das Speiseöl ein halbrohes Speiseöl ist, dadurch gekennzeichnet, daß das halbrohe Speiseöl vor der Durchführung des  
20 erfindungsgemäßen Verfahrens einen Phosphorgehalt von mehr als 500 Teilen pro Million (ppm) aufweist, und bei dem das Öl vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Wasser degummiert wurde.

- Vorzugsweise ist das halbrohe Speiseöl ein Öl, welches vor der Durchführung  
25 dieses Verfahrens einen Phosphorgehalt von mehr als 600 Teilen pro Million (ppm), bevorzugter mehr als 750 Teilen pro Million (ppm), aufweist.

Im allgemeinen wird das Degummieren eines Speiseöls mit Wasser den Phosphorgehalt im Öl auf ein Niveau von weniger als 500 ppm verringern.

5 Demgemäß kann ein halbrohes Öl wie hier beschrieben z.B. nur teilweise mit Wasser degummiert worden sein, bevor ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Verringerung des Niveaus an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl durchgeführt wird.

10 Der Begriff "teilweise mit Wasser degummiert" weist darauf hin, daß die Prozedur der Degummierung des Öls mit Wasser im Vergleich zu einem Standardverfahren der Degummierung mit Wasser nur ein partieller/kurzer Prozeß gewesen ist.

15 Ein "mit Wasser teilweise degummierendes" Verfahren kann durchgeführt werden, indem nur 0,5 % heißes Wasser in das Öl eingemischt werden (Standard ist 1-3 % heißes Wasser. Siehe hier den Abschnitt "Definitionen") oder die Behandlungszeitspanne auf 10 Minuten verringert wird (Standard ist 30-60 Minuten).

20 Alternativ kann ein halbrohes Öl wie hier definiert eine Mischung eines Rohöls und eines halbrohen Öls sein.

Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren gemäß irgendeinem der ersten Aspekte der Erfindung, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- 25
- i) Einstellen der Temperatur des Speiseöls auf eine Temperatur zwischen 25° C - 70° C;
  - ii) Vorbehandeln des Speiseöls bei der oben eingestellten Temperatur durch Zugabe von 0,5-6 % (als Gewicht, bezogen auf das Öl) einer



wäßrigen Lösung, die mindestens 85 % Wasser umfaßt, für 5-120 Minuten, wobei der Vorbehandlung keine Entfernung von hydratisiertem Mucilago und Phosphorgehalt im Öl folgt;

- 5      iii) Einstellen des pH-Werts der Wasser/Öl-Emulsion auf einen pH-Wert zwischen 1,5-8 (z.B. durch Zugabe einer geeigneten Menge einer NaOH-Lösung);
- 10      iv) Kontaktieren der Wasser/Öl-Emulsion mit einer wäßrigen Lösung einer Phospholipase (bei einer Temperatur (+/- 5° C), die gemäß Schritt i) eingestellt ist), wobei die Phospholipase in dem Öl emulgiert wird, bis der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 11 ppm verringert ist;
- v) Abtrennen der wäßrigen Phase von dem behandelten Öl.

15      Die Temperatur des Speiseöls in dem gerade oben beschriebenen Schritt i) wird vorzugsweise auf eine Temperatur eingestellt, welche die optimale Temperatur für die Phospholipase-Aktivität des im Verfahren eingesetzten Enzyms ist.

20      Für die im Handel erhältliche Phospholipase Lecitase<sup>TM</sup> (Novo Nordisk A/S) liegt diese bei etwa 60° C und für eine Phospholipase der Erfindung, die aus der Fadenpilzgattung *Fusarium* erhalten wurde, liegt sie bei etwa 45° C. Siehe die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele hinsichtlich weiterer Details bezüglich dieses Punkts.

25      Voraussichtlich wird eine Mehrheit von Fadenpilz-Phospholipasen ein Temperaturoptimum um 35 - 50° C besitzen.

Demgemäß betrifft eine Ausführungsform der Erfindung das gerade oben beschriebene Verfahren, bei dem die Temperatur des Speiseöls in Schritt i) auf eine

Temperatur zwischen 35° C - 50° C eingestellt ist und die in Schritt iv) eingesetzte Phospholipase aus einem Fadenpilz-Stamm stammt.

5 In Schritt ii) des obigen Verfahrens wird das Speiseöl bei der eingestellten Temperatur (Schritt i)) durch Zugabe von 0,5-6 % (nach Gewicht, bezogen auf das Öl) einer wäßrigen Lösung, die mindestens 85 % Wasser umfaßt, für 5-120 Minuten vorbehandelt, wobei der Vorbehandlung nicht die Entfernung von hydratisiertem Mucilago und Phosphorgehalt in dem Öl folgt.

10 Dieser Schritt ist ein Standard-Vorbehandlungsschritt bei der enzymatischen Degummierung von Speiseölen (US 5,264,367; US 5,558,781). Der Zweck von Schritt ii) besteht darin, die hydratisierbaren/hydrophilen Komponenten (z.B. der Gehalt an hydratisierbarem Phosphor) in dem Speiseöl zu hydratisieren, welche in dem Öl unlöslich werden, wenn sie hydratisiert sind.

15

Dieser Schritt unterscheidet sich jedoch von demjenigen, der im vorliegenden Kontext als "Degummierung eines Speiseöls mit Wasser" bezeichnet wird. Ein Hauptunterschied liegt darin, daß der Vorbehandlungsschritt nicht die hydratisierten Phosphatide und das Mucilago aus dem Öl entfernt. Die Entfernung der  
20 hydratisierten Bestandteile aus dem Öl ist der Hauptzweck der Degummierung von Speiseölen mit Wasser.

Demgemäß umfaßt das Öl, wenn die Phospholipase mit dem Öl in Schritt iv) oben kontaktiert wird, immer noch die hydratisierten Phosphatide und das Mucilago.

25

Mit anderen Worten, falls das Speiseöl ein nicht mit Wasser degummiertes Speiseöl ist, beschreibt das obige Verfahren ein vereinfachtes enzymatisches Degum-

mierungsverfahren, welches die hydratisierten Phosphatide und das Mucilago nicht aus dem Öl entfernt, bevor das Öl mit der Phospholipase kontaktiert wird.

- Vorzugsweise umfaßt die wäßrige Lösung mindestens 85 % Wasser (Schritt ii) oben) und umfaßt ferner Citronensäure. Vorzugsweise ist zwischen 1-15 % (Gew./Gew.) Citronensäure in der wäßrigen Lösung, bevorzugter ist zwischen 3-11 % (Gew./Gew.) Citronensäure in der wäßrigen Lösung.

- Vorzugsweise beträgt die Zeitspanne in Schritt ii) 15-50 Minuten und bevorzugter 15-30 Minuten.

Hinsichtlich weiterer Details bezüglich der Vorbehandlung in Schritt ii) oben wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

- 15 In Schritt iii) oben wird der pH-Wert der Wasser/Öl-Emulsion auf pH 1,5-8 eingestellt (z.B. durch Zugabe einer geeigneten Menge einer NaOH-Lösung). Dies erfolgt, um den pH-Wert des Öls einzustellen, bevor die Phospholipase in Schritt iv) mit Öl kontaktiert wird. Im allgemeinen wird der tatsächliche optimale pH-Wert von dem tatsächlichen Enzym abhängen, welches zur Kontaktierung des Öls in Schritt iv) eingesetzt wird. Hinsichtlich weiterer Details bezüglich dieses Punkts wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

- Im allgemeinen ist es gemäß dem ersten Aspekt und dessen Ausführungsformen der Erfindung bevorzugt, daß die Kontaktierung des Öls mit einer wäßrigen Lösung, die eine Phospholipase umfaßt, bei pH 1,5-6, bevorzugter bei pH 3-6, durchgeführt wird.

- Der pH-Wert in der Wasser-in-Öl-Emulsion wird gemessen durch Entnahme von 2 ml Wasser aus der Öl-Emulsion und Mischen mit 2 ml Wasser. Nach der Phasentrennung ist die resultierende obere Ölschicht abzupipettieren und der pH-Wert in der wäßrigen Phase zu messen. Die Messungen werden dann mit der folgenden
- 5 Formel  $\text{pH}_{\text{real}} = \text{pH}_{\text{gemessen}} - 0,38$  in "reale" pH-Werte umgerechnet. Hinsichtlich weiterer Details wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

- Vorzugsweise liegt in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Verringerung des Gehalts an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl die Menge einer
- 10 Phospholipase, die in dem Öl emulgiert wird, im Bereich von 0,1-15 mg Enzym (Trockensubstanz)/kg Öl, bevorzugter 0,25-5 mg Enzym (Trockensubstanz)/kg Öl und noch bevorzugter 0,25-2,5 mg Enzym (Trockensubstanz)/kg Öl.

- Im allgemeinen ist es vorteilhaft, sowohl die Menge an eingesetzter Phospholipase als auch die eingesetzte Zeit zur enzymatischen Degummierung eines Speiseöls zu optimieren, um einen Phosphorgehalt von weniger als 11 ppm zu erhalten. Die
- 15 tatsächliche optimale Enzymdosis und Zeitspanne wird u.a. von der tatsächlich eingesetzten Phospholipase abhängen. Hinsichtlich weiterer Details bezüglich der Optimierung der Enzymdosis und Zeitspanne des Verfahrens wird auf die hier
- 20 vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

- Vorzugsweise wird in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Verringerung des Gehalts an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 11 ppm verringert, nachdem das Öl mit 0,5-6 mg Phos-
- 25 pholipase (Trockensubstanz)/kg Öl kontaktiert wurde, wobei die Phospholipase mit dem Öl für eine Zeitspanne von 1-6 Stunden in Kontakt ist, bevorzugter wird der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 11 ppm verringert, nachdem das Öl mit 0,25-2,5 mg Phospholipase (Trockensubstanz)/kg Öl kontaktiert wurde, wobei

die Phospholipase mit dem Öl für eine Zeitspanne von 15 Minuten bis 2 Stunden in Kontakt ist.

Hinsichtlich weiterer Details bezüglich der Ermittlung optimaler Temperaturen für individuelle Phospholipasen siehe die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele.

Vorzugsweise wird in allen Aspekten und Ausführungsformen eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Verringerung des Gehalts an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 5 ppm verringert.

Der Phosphorgehalt in dem Öl wird als Teile pro Million (ppm) in der Ölphase des in der Öl-Emulsion vorliegenden Wassers gemessen. Die Analyse des Phosphorgehalts wird gemäß Prozedur 2.421 in "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7. Aufl. (1987)" durchgeführt. Hinsichtlich weiterer Details wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Verringerung des Gehalts an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl, bei dem die Phospholipase von einer Säugerspezies erhalten wird, insbesondere bei dem die Phospholipase von einer Bauchspeicheldrüse der Säugerspezies erhalten wird, und besonders bevorzugt, bei dem die Phospholipase von einer Schweinebauchspeicheldrüse erhalten wird.

Vorzugsweise wird in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Verringerung des Gehalts an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl die Phospholipase aus einem Mikroorganismus, vorzugsweise einem Fadenpilz, einer Hefe oder einem Bakterium, erhalten.

Vorzugsweise sind bevorzugte Stämme, wenn der gerade oben erwähnte Fadenpilz eine Spezies innerhalb der Gattung *Fusarium* ist, solche Stämme wie z.B. ein Stamm von *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* oder insbesondere ein  
5 Stamm von *F. oxysporum*.

Ferner sind bevorzugte Stämme, wenn der obige Fadenpilz eine Spezies innerhalb der Gattung *Aspergillus* ist, solche Stämme wie z.B. ein Stamm von *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* oder ins-  
10 besondere *Aspergillus oryzae*.

Ferner ist in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Verringerung des Gehalts an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl das Speiseöl vorzugsweise ein Sojabohnenöl, Sonnenblumenöl oder bevorzugter ein Rapsöl.  
15

#### Charakterisierung einer aus *Fusarium oxysporum* erhaltenen Phospholipase

Eine Phospholipase der Erfindung, erhalten aus *Fusarium oxysporum*, wurde eingehend charakterisiert.  
20

Demgemäß ist ein Aspekt der Erfindung vorzugsweise eine isolierte Phospholipase A, welche aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten wird und eine Phospholipase A-Aktivität im pH-Bereich 3-10, gemessen bei 40° C, bevorzugter eine Phospholipase A-Aktivität im pH-Bereich 3-7, gemessen bei 40° C, bevorzugter eine Phospholipase A-Aktivität im pH-Bereich 3,5-6, gemessen bei 40° C,  
25 und noch bevorzugter eine Phospholipase A-Aktivität im pH-Bereich 4,5-5,5, gemessen bei 40° C, aufweist.

Die Phospholipase A-Aktivität wurde mit Sojabohnen-Lecithin als Substrat in einem Assay bestimmt, der auf einem NEFA-Test-basiert, oder in einem Puffer, der 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR) umfaßt. Siehe die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele hinsichtlich weiterer Details.

5

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist eine isolierte Phospholipase A, welche aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten wird, vorzugsweise eine, die eine Molekülmasse von  $29 \pm 10$  kD, bevorzugter eine Molekülmasse von  $29 \pm 5$  kD, noch bevorzugter eine Molekülmasse von  $29 \pm 3$  kD und am meisten  
10 bevorzugt eine Molekülmasse von  $29 \pm 2$  kD aufweist.

Die Molekülmasse wird mittels SDS-PAGE-Elektrophorese gemessen wie im Abschnitt "Materialien und Methoden" (siehe unten) näher beschrieben.

15 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist eine isolierte Phospholipase A, welche aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten wird, vorzugsweise eine, die einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich 4,5-8, bevorzugter einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich 5-7,5 und noch bevorzugter einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich 5,5-7,5 aufweist.

20

Der isoelektrische Punkt (pI) wurde unter Verwendung von Ampholine-PAGE-Platten von Pharmacia bestimmt. Hinsichtlich weiterer Details siehe das hier vorliegende Arbeitsbeispiel (siehe unten).

25 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist eine isolierte Phospholipase A, welche aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten wird, vorzugsweise eine, die ein Temperaturoptimum für die Phospholipase-Aktivität im Bereich zwischen 25-55° C, gemessen mit Lecithin als Substrat bei pH 5, bevorzugter im Be-

reich von 30-50° C, gemessen mit Lecithin als Substrat bei pH 5, und noch bevorzugter im Bereich von 40-50° C, gemessen mit Lecithin als Substrat bei pH 5, besitzt.

- 5 Das Temperaturoptimum für Phospholipase-Aktivität wurde in einem Puffer, der 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson-Puffer enthält, bei pH 5 gemessen. Hinsichtlich weiterer Details siehe das hier vorliegende Arbeitsbeispiel (siehe unten).
- 10 In einer noch weiteren Ausführungsform der Erfindung ist eine isolierte Phospholipase A, welche aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten wird, vorzugsweise eine, die ein pH-Optimum der Phospholipase-Aktivität im pH-Bereich von 6-12 bei 37° C, bevorzugter im pH-Bereich von 7-11,5 bei 37° C, bevorzugter im pH-Bereich von 8-11 bei 37° C und noch bevorzugter im pH-Bereich von 8,5-11 bei 37° C aufweist.

Das pH-Optimum der Phospholipase-Aktivität wurde in einem Puffer, der 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson-Puffer (BR) enthält, bei 37° C bestimmt. Hinsichtlich weiterer Details siehe die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele.

- Vorzugsweise umfaßt eine Phospholipase der Erfindung mindestens zwei der fünf (als i) bis v) numerierten) obengenannten physikalischen Eigenschaften des Enzyms, bevorzugter umfaßt eine Phospholipase der Erfindung mindestens drei der fünf (als i) bis v) numerierten) obengenannten physikalischen Eigenschaften des Enzyms, noch bevorzugter umfaßt eine Phospholipase der Erfindung mindestens vier der fünf (als i) bis v) numerierten) obengenannten physikalischen Eigenschaften des Enzyms und am meisten bevorzugt umfaßt eine Phospholipase der



Erfindung alle der fünf (als i) bis v) numerierten) obengenannten physikalischen Eigenschaften des Enzyms.

Wie oben beschrieben, wurde eine Phospholipase der Erfindung kloniert, rekombinant exprimiert, gereinigt und die N-terminalen und C-terminalen Sequenzen des aktiven sekretierten Enzyms wurden bestimmt.

Dementsprechend betrifft eine weitere Ausführungsform der Erfindung ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase A-Aktivität, wobei das Polypeptid aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten wird und

- i) PLA-Aktivität im pH-Bereich von 3-10, gemessen bei 40° C,
- ii) eine Molekülmasse von  $29 \pm 10$  kD, wie bestimmt durch SDS-PAGE,
- 15    iii) einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich von 4,5-8,
- iv) ein Temperaturoptimum für Phospholipase-Aktivität im Bereich von 25-55° C, gemessen mit Lecithin als Substrat bei pH 5, und/oder
- 20    v) ein pH-Optimum der Phospholipase-Aktivität im pH-Bereich von 6-12, gemessen mit Lecithin als Substrat bei 37° C, aufweist

und ferner eine Aminosäuresequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend:

- 25    (a) ein Polypeptid, das von dem für das Enzym Phospholipase A kodierenden Abschnitt der DNA-Sequenz kodiert wird, welche in das Plasmid pYES 2.0 kloniert ist, das in *Escherichia coli* DSM 11299 vorliegt,
- (b) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz wie in den Positionen 31-346 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt,
- 30    (c) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz wie in Position 31-303 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt,

- (d) ein Analogon des in (a), (b) oder (c) definierten Polypeptids, welches mindestens zu 70 % homolog zu dem Polypeptid ist, und
- (e) ein Fragment von (a), (b), (c) oder (d).

- 5 In einer Ausführungsform der Erfindung ist das isolierte Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung eine Phospholipase mit Phospholipase A1-Aktivität.

- 10 In einer weiteren Ausführungsform ist das isolierte Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung eine Phospholipase mit Phospholipase A2-Aktivität und in einer noch weiteren Ausführungsform ist das isolierte Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung eine Phospholipase mit Phospholipase B-Aktivität.

- 15 Vorzugsweise ist das isolierte Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung eine Phospholipase mit Phospholipase A1-Aktivität.

- 20 Hinsichtlich spezieller Beispiele von Standardtechniken zur Messung individueller PLA1-, PLA2- und/oder PLB-Aktivität wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

- 25 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung, wobei die Phospholipase eine Phospholipase ist, die im wesentlichen unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist, gemessen als relative Phospholipase-Aktivität bei 5 mM EDTA und 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in einem Assay der Phospholipase-Aktivität, welcher die Freisetzung freier Fettsäuren aus Lecithin in einem Puffer mißt, der 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Citrat, pH 5, umfaßt, inkubiert für 10 Minuten bei 37° C, gefolgt von Ab-

stoppen der Reaktion bei 95° C für 5 Min., wobei das Verhältnis der relativen Phospholipase-Aktivität bei 5 mM EDTA/5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  größer als 0,25 ist, bevorzugter größer als 0,5 und am meisten bevorzugt größer als 0,80.

- 5 Hinsichtlich weiterer Details bezüglich der Messung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

10 Einige Lipasen können eine begrenzte Phospholipase-Aktivität aufweisen. Im vorliegenden Kontext ist eine solche begrenzte Phospholipase-Aktivität der Lipasen definiert als "eine Lipase mit Phospholipase-Nebenaktivität" (siehe hier den Abschnitt "Definitionen"). Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität, wobei die Phospholipase-Aktivität des isolierten Polypeptids hoch genug ist, um von industrieller Bedeutung zu sein.

15 Demgemäß betrifft die Erfindung ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung, wobei die Phospholipase eine Phospholipase mit einer Phospholipase-Aktivität ist, die mindestens 0,25 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 0,40 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis:  
20 60 µg, beträgt, gemessen in einem Monoschicht-Phospholipase-Assay wie folgt:

- a. in einer Monoschicht-Apparatur (Trog nullter Ordnung) wird auf eine sorgfältig gereinigte Oberfläche einer Pufferlösung (10 mM TRIS, pH 8,0, 25° C) eine Monoschicht des Phospholipids DDPC (Di-decanoyl (C10) phosphatidylcholin) aus einer Chloroformlösung ausgebreitet;  
25 b. nach Relaxation der Monoschicht (Verdampfung des Chloroforms) wird der Oberflächendruck auf 15 mN/m, entsprechend einer mittleren Molekülfläche von DDPC von etwa 63 Å<sup>2</sup>/Molekül, eingestellt;  
c. eine Pufferlösung (wie oben), enthaltend 60 µg Enzym, wird durch die  
30 Monoschicht in die untere Phase der Reaktionskammer (Zylinder mit einer

Fläche von  $1520 \text{ mm}^2$  und einem Volumen von  $30400 \text{ mm}^3$ ) in dem "Trog nullter Ordnung" gespritzt;

- d. die enzymatische Aktivität wird bestimmt durch die Geschwindigkeit einer mobilen Barriere, welche die Monoschicht zusammendrückt, um einen konstanten Oberflächendruck aufrechtzuerhalten, wenn unlösliche Substratmoleküle in stärker wasserlösliche Reaktionsprodukte hydrolysiert werden, wobei die Anzahl der pro Minute durch das Enzym hydrolysierten DDPC-Moleküle anhand der mittleren Molekülfläche (MMF) von DDPC bestimmt wird.

10

Hinsichtlich weiterer Beschreibungen von bevorzugten Graden an Phospholipase-Aktivitäten für ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung siehe den Abschnitt "Definitionen" und die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele.

15

Ferner kann die spezifische Phospholipase-Aktivität einer Phospholipase gemäß der Erfindung mit bekannten Standard-Assays der Phospholipase-Aktivität gemessen werden.

- 20 Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung in einer weiteren Ausführungsform ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung, wobei die Phospholipase eine Phospholipase ist, die eine Phospholipase-Aktivität aufweist, welche in der Lage ist, mindestens  $7 \text{ } \mu\text{Mol}$  freier Fettsäure/Min./mg Enzym, bevorzugter mindestens  $15 \text{ } \mu\text{Mol}$  freier Fettsäure/Min./mg Enzym, noch bevorzugter mindestens  $30 \text{ } \mu\text{Mol}$  freier Fettsäure/Min./mg Enzym und am meisten bevorzugt mindestens  $50 \text{ } \mu\text{Mol}$  freier Fettsäure/Min./mg Enzym freizusetzen, gemessen wie folgt:

die Phospholipase-Aktivität wird in einem Assay gemessen, welcher die Freisetzung freier Fettsäuren aus Lecithin in einem Puffer mißt, der 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Citrat, pH 5, enthält, inkubiert für 10 Min. bei 37° C, gefolgt von Abstoppen der Reaktion bei 95° C für 5 Min.

5

Hinsichtlich weiterer Details bezüglich dieser Ausführungsform der Erfindung wird auf die hier vorliegenden Arbeitsbeispiele verwiesen.

Ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung eignet sich sehr zur Durchführung einer enzymatischen Degummierung eines Speiseöls.

Dementsprechend betrifft die Erfindung:

1. ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung, wobei die Phospholipase in der Lage ist, eine enzymatische Degummierung eines Speiseöls gemäß einem Verfahren der Erfindung durchzuführen, um den Gehalt an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl, das einen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor von mindestens 50 ppm enthält, zu verringern, und
2. ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung, wobei die Phospholipase in der Lage ist, eine enzymatische Degummierung eines mit Wasser degummierten Speiseöls (mit einem Phosphorgehalt von 50-250 ppm) durchzuführen, wodurch der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 11 ppm verringert wird, wobei das enzymatische Degummierungsverfahren umfaßt, daß das Öl bei einem pH-Wert von 1,5-8 mit einer wäßrigen Lösung der Phospholipase kontaktiert wird, welche in dem Öl emulgiert wird, bis der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 11 ppm verringert ist, und anschließend die wäßrige Phase von dem behandelten Öl abgetrennt wird.

Vorzugsweise ist das isolierte Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung in der Lage, das enzymatische Degummierungsverfahren des mit Wasser degummierten Speiseöls (wie gerade oben definiert) in weniger als 1,5  
5 Stunden und unter Einsatz von weniger als 2 mg Phospholipase (Trockensubstanz)/kg Öl durchzuführen.

Vorzugsweise wird ein isoliertes Polypeptid, welches Phospholipase-Aktivität zeigt und die oben gezeigten charakteristischen Eigenschaften der Erfindung hat,  
10 aus einem Fadenpilz-Stamm innerhalb der Gattung *Fusarium* erhalten.

Ohne sich auf eine Theorie festlegen zu wollen, wird jedoch derzeit davon ausgegangen, daß eine Phospholipase der Erfindung auch von anderen Mikroorganismen erhalten werden kann, vorzugsweise einem anderen Fadenpilz-Stamm. Beispiele davon sind im Abschnitt "Mikrobielle Quellen" (siehe unten) angegeben.  
15

#### Klonierte DNA-Sequenz

Trotz einer Reihe technischer Schwierigkeiten (siehe Abschnitt "Protokoll zur Klonierung einer Fadenpilz-Phospholipase", siehe unten) waren die vorliegenden  
20 Erfinder in der Lage, eine Phospholipase, die PLA-Aktivität zeigt, aus einem Stamm der Gattung *Fusarium*, spezieller *Fusarium oxysporum*, zu klonieren.

Ferner wird derzeit angenommen, daß es möglich ist, auf Grundlage der in der vorliegenden Anmeldung bereitgestellten Sequenzinformation eine für eine verwandte Phospholipase A und/oder auch eine für eine Phospholipase B kodierende  
25 DNA-Sequenz zu klonieren.

Dementsprechend betrifft ein Aspekt der Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz, kodierend für ein Enzym, das Phospholipase A- und/oder Phospholipase B-

Aktivität aufweist, wobei die DNA-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend:

- 5 (a) den für Phospholipase A kodierenden Abschnitt des Polynukleotids, welches in das Plasmid pYES 2.0 kloniert ist, das in *Escherichia coli* DSM 11299 vorliegt;
- (b) die DNA-Sequenz, welche in den Positionen 23-1063 in SEQ-ID-Nr. 1, bevorzugter in den Positionen 113-1063 in SEQ-ID-Nr. 1 oder noch bevorzugter in den Positionen 113-929 in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellt ist, oder  
10 deren komplementärer Strang;
- (c) eine DNA-Sequenz, welche mindestens zu 70 % homolog zu der in (a) oder (b) definierten DNA-Sequenz ist;
- (d) eine in (a) oder (b) definierte DNA-Sequenz, welche für ein Polypeptid kodiert, das Phospholipase-Aktivität zeigt und mindestens zu 70 % homolog zu der in den Positionen 31-346 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellten Polynukleotidsequenz ist oder bevorzugter mindestens zu 70 % homolog zu der in den Positionen 31-303 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellten Polynukleotidsequenz ist;  
15
- (e) eine DNA-Sequenz, welche bei niedriger Stringenz mit einer doppelsträngigen DNA-Sonde, umfassend die in den Positionen 23-1063 in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellte DNA-Sequenz, hybridisiert;  
20
- (f) eine DNA-Sequenz, welche für ein Polypeptid mit den Aminosäuresequenzen der Reste 1-346, 31-346 oder 31-303 von SEQ-ID-Nr. 2 oder den Aminosäuresequenzen, welche von irgendeiner der DNA-Sequenzen von (e) kodiert werden, kodiert; und  
25
- (g) eine DNA-Sequenz, welche ein Fragment der DNA-Sequenzen ist, die in (a), (b), (c), (d), (e) oder (f) angegeben sind.

In dieser Beschreibung soll, wann immer auf den für Phospholipase kodierenden  
30 Abschnitt der DNA-Sequenz verwiesen wird, welche in das Plasmid pYES 2.0

kloniert ist, das in DSM 11299 vorliegt, eine solche Bezugnahme auch den für Phospholipase kodierenden Abschnitt der DNA-Sequenz einschließen, die in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellt ist.

- 5 Dementsprechend können die Begriffe "der für Phospholipase kodierende Abschnitt der DNA-Sequenz, welche in das Plasmid pYES 2.0 kloniert ist, das in DSM 11299 vorliegt" und "der für Phospholipase kodierende Abschnitt der DNA-Sequenz, die in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellt ist", austauschbar verwendet werden.
- 10 Die DNA-Sequenz kann genomische DNA, cDNA oder synthetischen Ursprungs oder irgendeine Kombination davon sein.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch eine klonierte DNA-Sequenz, welche für ein Enzym mit der als reifer Teil von SEQ-ID-Nr. 2 angegebenen Aminosäuresequenz, das Phospholipase A- und/oder Phospholipase B-Aktivität aufweist, kodiert, welche sich von SEQ-ID-Nr. 1 aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet.

- 20 Die DNA-Sequenz, die in SEQ-ID-Nr. 1 und/oder einer analogen DNA-Sequenz der Erfindung dargestellt ist, kann aus einem Stamm des Fadenpilzes *Fusarium oxysporum* kloniert werden, der das Enzym mit Phospholipase-Aktivität produziert, oder einem anderen oder verwandten Organismus wie im folgenden näher beschrieben (siehe Abschnitt "Mikrobielle Quellen").

- 25 Alternativ kann die analoge Sequenz auf der Grundlage der DNA-Sequenz konstruiert werden, welche als der für Phospholipase kodierende Abschnitt von SEQ-ID-Nr. 1 dargestellt ist, z.B. eine Subsequenz davon sein, und/oder kann durch Einführung von Nukleotidsubstitutionen konstruiert werden, welche nicht zu einer



- anderen Aminosäuresequenz der von der DNA-Sequenz kodierten Phospholipase führen, sondern der Codonverwendung des Wirtsorganismus entsprechen, der zur Produktion des Enzyms vorgesehen ist, oder durch Einführung von Nukleotidsubstitutionen, welche zu einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz führen können
- 5 (d.h., einer Variante der Phospholipase der Erfindung).

- Bei der Durchführung von Nukleotidsubstitutionen sind Aminosäureveränderungen vorzugsweise geringfügiger Natur, d.h., konservative Aminosäuresubstitutionen, welche die Faltung oder Aktivität des Proteins nicht signifikant
- 10 beeinflussen; kleine Deletionen, typischerweise von 1 bis etwa 30 Aminosäuren, kleine amino- oder carboxyterminale Verlängerungen, z.B. ein aminoterminaler Methioninrest, ein kleines Linkerpeptid von bis zu etwa 20-25 Resten oder eine kleine Verlängerung, welche die Reinigung erleichtert, z.B. ein Polyhistidin-Abschnitt, ein antigenes Epitop oder eine bindende Domäne.

15

- Beispiele konservativer Substitutionen gibt es innerhalb der Gruppe basischer Aminosäuren, z.B. Arginin, Lysin, Histidin, saurer Aminosäuren, z.B. Glutaminsäure und Asparaginsäure, polarer Aminosäuren, z.B. Glutamin und Asparagin, hydrophober Aminosäuren, z.B. Leucin, Isoleucin, Valin, aromatischer Aminosäuren, z.B. Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, und kleiner Aminosäuren, z.B. Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Methionin. Hinsichtlich einer allgemeinen Beschreibung der Nukleotidsubstitution siehe beispielsweise Ford et al., (1991), Protein Expression and Purification 2, 95-107.
- 20

- 25 Es wird für Fachleute auf dem Gebiet ersichtlich sein, daß solche Substitutionen außerhalb der Bereiche, welche für die Funktion des Moleküls kritisch sind, vorgenommen werden und immer noch zu einem aktiven Polypeptid führen können. Aminosäuren, die für die Aktivität des Polypeptids, welches von der klonierten DNA-Sequenz der Erfindung kodiert wird, essentiell sind und deshalb vorzugs-

- weise keiner Substitution unterworfen werden, können nach im Stand der Technik bekannten Verfahren identifiziert werden, wie z.B. stellengerichtete Mutagenese oder Alanin-Scanning-Mutagenese (vgl. z.B. Cunningham und Wells, (1989), Science 244, 1081-1085). Bei der letzteren Technik werden Mutationen an jedem
- 5 Rest im Molekül eingeführt und die resultierenden Mutantenmoleküle werden hinsichtlich biologischer (d.h., Phospholipase-) Aktivität getestet, um Aminosäurereste zu identifizieren, welche für die Aktivität des Moleküls kritisch sind. Stellen von Substrat-Enzym-Wechselwirkung können auch durch Analyse der Kristallstruktur festgestellt werden, wie beispielsweise durch solche Techniken wie
- 10 magnetische Kernresonanz-Analyse, Kristallographie oder Photoaffinitätsmarkierung (vgl. z.B. de Vos et al., (1992), Science 255, 306-312; Smith et al., (1992), J. Mol. Biol. 224, 899-904; Wlodaver et al., (1992), FEBS Lett. 309, 59-64) festgestellt.
- 15 Polypeptide der vorliegenden Erfindung umfassen auch fusionierte Polypeptide oder spaltbare Fusionspolypeptide, bei denen ein anderes Polypeptid am N-Terminus oder C-Terminus des Polypeptids oder eines Fragments davon fusioniert ist. Ein fusioniertes Polypeptid wird hergestellt durch Fusionierung einer Nukleinsäuresequenz (oder eines Abschnitts davon), kodierend für ein anderes
- 20 Polypeptid, mit einer Nukleinsäuresequenz (oder einem Abschnitt davon) der vorliegenden Erfindung. Techniken zur Herstellung fusionierter Polypeptide sind im Stand der Technik bekannt und umfassen die Ligierung der kodierenden Sequenzen, welche für die Polypeptide kodieren, so daß sie sich im Leserahmen befinden und so daß die Expression des fusionierten Polypeptids unter der Kontrolle desselben Promotors (derselben Promotoren) und desselben Terminators
- 25 steht.

Die DNA-Sequenz der Erfindung kann aus dem Stamm *Escherichia coli* DSM Nr. 11299 unter Anwendung von Standardklonierungstechniken, wie z.B. von Sam-

brook et al., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, beschrieben, kloniert werden.

- Nachdem die Erfinder das Problem der Entwicklung eines geeigneten Screening-
- 5 Assays zur Verwendung in einer Expressionsklonierungstechnik, um eine Phospholipase der Erfindung zu klonieren, lösten, siehe den Abschnitt mit der Überschrift "Protokoll zur Klonierung einer Fadenpilz-Phospholipase", kann die DNA-Sequenz der Erfindung nun nach irgendeinem allgemeinen Verfahren kloniert werden, welches beinhaltet
- 10 • Klonierung, in geeigneten Vektoren, einer cDNA-Bank aus irgendeinem Organismus, von dem erwartet wird, daß er die Phospholipase von Interesse produziert,
- Transformieren geeigneter Hefewirtszellen mit den Vektoren,
- Kultivierung der Wirtszellen unter geeigneten Bedingungen, um irgendein
- 15 Enzym von Interesse zu exprimieren, welches von einem Klon in der cDNA-Bank kodiert wird,
- Screening hinsichtlich positiver Klone durch Bestimmung etwaiger Phospholipase-Aktivität des Enzyms, welches von solchen Klonen produziert wird, und
- 20 • Isolierung der für das Enzym kodierenden DNA aus solchen Klonen.

Alternativ kann, nachdem die vorliegende Erfindung zum ersten Mal eine klonierte DNA-Sequenz bereitstellt, die für ein Fadenpilz-PLA-Enzym kodiert, die DNA, die für eine Phospholipase der Erfindung kodiert, nach wohlbekannten Ver-

25 fahren bequem aus irgendeiner geeigneten Quelle, wie z.B. irgendwelcher der im Abschnitt "Mikrobielle Quellen" genannten Organismen, durch Verwendung synthetischer Oligonukleotid-Sonden, die auf Grundlage einer hier offenbarten DNA-Sequenz hergestellt wurden, kloniert werden. Beispielsweise kann eine geeignete Oligonukleotid-Sonde auf Grundlage des für Phospholipase kodierenden

30 Abschnitts der hier als SEQ-ID-Nr. 1 präsentierten Nukleotidsequenzen oder ir-

gendeiner geeigneten Subsequenz davon oder auf Grundlage der Aminosäuresequenz SEQ-ID-Nr. 2 hergestellt werden.

5 Ferner sind, nachdem eine klonierte DNA-Sequenz der Erfindung für ein Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität gemäß der Erfindung kodiert, eine Reihe der speziellen Ausführungsformen, die sich auf ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität der Erfindung beziehen, auch Ausführungsformen der Erfindung für eine klonierte DNA-Sequenz der Erfindung, die für ein Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität kodiert. Folglich betreffen Referenzen und bevorzugte  
10 und am meisten bevorzugte Ausführungsformen des isolierten Polypeptids mit Phospholipase-Aktivität auch eine klonierte DNA-Sequenz der Erfindung.

Dementsprechend betrifft eine Ausführungsform der Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz gemäß der Erfindung, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte  
15 Phospholipase eine Phospholipase A1 ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist eine klonierte Sequenz gemäß der Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase eine Phospholipase A2 ist, und in einer noch weiteren Ausführungsform ist eine klonierte Sequenz gemäß der Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase eine Phospholipase B ist.  
20

Vorzugsweise kodiert die klonierte DNA-Sequenz gemäß der Erfindung für ein  
25 Polypeptid mit Phospholipase A1-Aktivität.

Ferner betrifft die Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz gemäß der Erfindung, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase eine Phospholipase ist,

welche von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im wesentlichen unabhängig ist, gemessen als:

relative Phospholipase-Aktivität bei 5 mM EDTA und 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in einem Assay  
5 der Phospholipase-Aktivität, welcher die Freisetzung von freien Fettsäuren aus Lecithin in einem Puffer mißt, der 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Citrat, pH 5, enthält, inkubiert für 10 Min. bei 37° C, gefolgt von Abstoppen der Reaktion bei 95° C für 5 Minuten,

10 wobei das Verhältnis der relativen Phospholipase-Aktivität bei 5 mM EDTA/5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ein Verhältnis ist, welches größer als 0,25 ist, bevorzugter ein Verhältnis, welches größer als 0,5 ist.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz gemäß der  
15 Erfindung, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase eine Phospholipase mit einer Phospholipase-Aktivität ist, die mindestens 0,25 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 0,40 nMol/Min. bei 25° C, Enzymdosis: 60 µg, beträgt, gemessen in einem Monoschicht-Phospholipase-Assay wie folgt:

20

- a. in einer Monoschicht-Apparatur (Trog nullter Ordnung) wird auf eine sorgfältig gereinigte Oberfläche einer Pufferlösung (10 mM TRIS, pH 8,0, 25° C) eine Monoschicht des Phospholipids DDPC (Di-decanoyl (C10) phosphatidylcholin) aus einer Chloroform-Lösung ausgebreitet;
- 25 b. nach Relaxation der Monoschicht (Verdampfung von Chloroform) wird der Oberflächendruck auf 15 mN/m, entsprechend einer mittleren Molekülfläche von DDPC von etwa 63 Å<sup>2</sup>/Molekül, eingestellt;
- c. eine Pufferlösung (wie oben), enthaltend 60 µg Enzym, wird durch die Monoschicht in die untere Phase der Reaktionskammer (Zylinder mit einer  
30 Fläche von 1520 mm<sup>2</sup> und einem Volumen von 30400 mm<sup>3</sup>) in dem "Trog nullter Ordnung" gespritzt;

- d. die enzymatische Aktivität wird durch die Geschwindigkeit einer mobilen Barriere bestimmt, welche die Monoschicht zusammendrückt, um einen konstanten Oberflächendruck aufrechtzuerhalten, wenn unlösliche Substratmoleküle in stärker wasserlösliche Reaktionsprodukte hydrolysiert werden, wobei die Anzahl der pro Minute durch das Enzym hydrolysierten DDPC-Moleküle anhand der mittleren Molekülfläche (MMF) von DDPC bestimmt wird.

10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz gemäß der Erfindung, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase eine Phospholipase ist, welche eine Phospholipase-Aktivität aufweist, die in der Lage ist, mindestens 7  $\mu\text{Mol}$  freier Fettsäure/Min./mg Enzym, bevorzugter mindestens 15  $\mu\text{Mol}$  freier Fettsäure/Min./mg Enzym freizusetzen, gemessen wie folgt:

15

die Phospholipase-Aktivität wird in einem Assay gemessen, welcher die Freisetzung freier Fettsäuren aus Lecithin in einem Puffer mißt, der 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Citrat, pH 5, enthält; inkubiert für 10 Minuten bei 37° C, gefolgt von Abstoppen der Reaktion bei 95° C für 5 Minuten.

20

In weiteren Ausführungsformen betrifft die Erfindung:

eine klonierte DNA-Sequenz gemäß der Erfindung, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase in der Lage ist, eine enzymatische Degummierung eines Speiseöls gemäß einem Verfahren der Erfindung durchzuführen, um den Gehalt an phosphorhaltigen Komponenten in einem Speiseöl, das einen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor von mindestens 50 ppm enthält, zu verringern, und

eine klonierte DNA-Sequenz gemäß der Erfindung, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase in der Lage ist, eine enzymatische Degummierung eines mit Wasser degummierten Speiseöls (mit einem Phosphorgehalt von 50-250 ppm) durchzuführen und dadurch den Phosphorgehalt des Öls auf weniger

als 11 ppm zu verringern, wobei das enzymatische Degummierungsverfahren umfaßt, daß das Öl bei einem pH-Wert von 1,5-8 mit einer wäßrigen Lösung der Phospholipase kontaktiert wird, welche in dem Öl emulgiert wird, bis der Phosphorgehalt des Öls auf weniger als 11 ppm verringert ist, und dann die wäßrige Phase von dem behandelten Öl abgetrennt wird.

Vorzugsweise ist eine klonierte DNA-Sequenz gemäß der Erfindung eine klonierte DNA-Sequenz, wobei die von der DNA-Sequenz kodierte Phospholipase in der Lage ist, das Verfahren der enzymatischen Degummierung des mit Wasser degummierten Speiseöls durchzuführen, indem weniger als 2 mg Phospholipase (Trockensubstanz)/kg Öl verwendet werden, und wobei die Phospholipase mit dem Öl für eine Zeitspanne von 15 Minuten bis 2 Stunden in Kontakt ist.

#### Protokoll zur Klonierung einer Fadenpilz-Phospholipase

15

Beim Versuch, eine Phospholipase der Erfindung zu isolieren oder ein dafür kodierendes Polynukleotid zu klonieren, traten eine Reihe technischer Schwierigkeiten auf. Es erschien unmöglich, das Enzym zu isolieren, und so wurde das Problem der Klonierung des Polynukleotids angegangen.

20

Wie hier beschrieben, stand keine frühere DNA-Sequenz, die für eine Fadenpilz-Phospholipase A kodierte, zur Verfügung. Folglich entwickelten die Erfinder eine Klonierungsstrategie, die auf der Technik der Expressionsklonierung in Hefe basierte (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260, WO 93/11249 und WO 94/14953).

25

Eines der Hauptprobleme, denen bei dieser Technik begegnet wurde, bestand darin, daß Hefe eine interne Aktivität produziert, welche zu einem Phospholipase-Hintergrund auf Platten-Assays führt. Dieser Hintergrund wurde befunden, von

der Menge an Substrat in den Assay-Platten stark abhängig zu sein, und die Substratmenge mußte somit sorgfältig auf ein Niveau titriert werden, wo der Hintergrund niedrig genug war, damit der Assay während des Screening-Verfahrens der Expressionsklonierung verläßlich war, jedoch hoch genug, daß die Reaktion stattfand.

Ferner umfassen Fadenpilz-Stämme im allgemeinen eine Reihe verschiedener Lipasen, von denen einige sogar eine begrenzte Phospholipase-Aktivität aufweisen. Solche Lipasen werden hier als "eine Lipase mit Phospholipase-Nebenaktivität" definiert (siehe hier den Abschnitt "Definitionen").

Bei dem Platten-Assay wurde der Hintergrund solcher Lipasen mit Phospholipase-Nebenaktivität ebenfalls als stark abhängig von der Menge an Substrat in den Assay-Platten befunden und die Substratmenge mußte somit sogar noch sorgfältiger titriert werden, um die Hintergrundaktivität von sowohl den Hefezellen als auch den Fadenpilz-Lipasen mit Phospholipase-Nebenaktivität zu eliminieren.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß eine sorgfältige Auswahl des Substrats vorgenommen werden mußte, nachdem viele keinerlei funktionelle Lösung für dieses Problem boten, da eine Reihe der getesteten Phospholipase-Substrate eine Hintergrundaktivität ergaben, weil Lipasen ohne Phospholipase-Aktivität in der Lage waren, mit den Substraten zu reagieren. Dementsprechend mußte eine große Anzahl von Substraten getestet und titriert werden, um ein geeignetes Substrat zu identifizieren.

Die gefundene Lösung, um es zu ermöglichen, die Expressionsklonierung eines für Phospholipase kodierenden Polynukleotids durchzuführen, war die Verwendung von Lipoid E80 (von Lipoid GmbH) in sorgfältig überwachten Konzentrationen. Im hier vorliegenden Abschnitt "Materialien und Methoden" wird eine



detaillierte Beschreibung des vollständigen Protokolls der Expressionsklonierung in Hefe offenbart, einschließlich eines Platten-Assays, der die oben beschriebenen Probleme löst.

## 5 Homologie/Identität von DNA-Sequenzen

Die oben angesprochene DNA-Sequenzhomologie/identität wird bestimmt als der Grad an Identität zwischen zwei Sequenzen, der eine Abweichung der ersten Sequenz von der zweiten angibt. Die Homologie kann geeigneterweise mit Hilfe von

10 im Stand der Technik bekannten Computerprogrammen bestimmt werden, wie z.B. GAP, bereitgestellt in dem GCG-Programmpaket (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., und Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). Bei Verwendung von

15 GAP mit den folgenden Einstellungen für den DNA-Sequenzvergleich: GAP-Erstellungslimit von 5,0 und GAP-Extensionslimit von 0,3, zeigt der kodierende Bereich der DNA-Sequenz einen Grad der Identität von vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, noch bevorzugter mindestens 97 % mit dem für Phospholipase kodierenden Abschnitt der in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-

20 Sequenz (d.h., Positionen 23-1063 in SEQ-ID-Nr. 1) oder bevorzugter mit der in den Positionen 113-1063 in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz (Position 113 entspricht dem N-terminalen Rest des reifen Enzyms) oder sogar noch bevorzugter mit der DNA-Sequenz, die in Position 23-929 in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellt

25 ist (Position 929 entspricht dem C-terminalen Rest bei dem C-terminal prozessierten sekretierten aktiven Enzym).

### Hybridisierung

- Die oben angesprochene Hybridisierung soll eine analoge DNA-Sequenz umfassen, welche mit einer doppelsträngigen DNA-Sonde, die dem für Phospholipase
- 5 kodierenden Abschnitt der in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz entspricht, d.h., den Nukleotiden 23-1063, oder bevorzugter mit einer doppelsträngigen DNA-Sonde, die der in Position 113-1063 in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz entspricht (Position 113 entspricht dem N-terminalen Rest des reifen Enzyms) oder noch bevorzugter mit einer doppelsträngigen DNA-Sonde, die
- 10 der in Position 23-929 in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz entspricht (Position 929 entspricht dem C-terminalen Rest in dem C-terminal prozessierten sekretierten aktiven Enzym), mindestens unter Bedingungen niedriger Stringenz hybridisiert, wie detailliert im folgenden beschrieben.
- 15 Geeignete Versuchsbedingungen zur Feststellung der Hybridisierung bei niedriger, mittlerer oder hoher Stringenz zwischen einer Nukleotid-Sonde und einer homologen DNA- oder RNA-Sequenz beinhalten das Vortränken des Filters, welcher die DNA-Fragmente oder RNA enthält, um in 5 x SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat, Sambrook et al., 1989) 10 Min. lang zu hybridisieren, und die
- 20 Vorhybridisierung des Filters in einer Lösung von 5 x SSC, 5 x Denhardts Lösung (Sambrook et al., 1989), 0,5 % SDS und 100 µg/ml denaturierter beschallter Lachssperma-DNA (Sambrook et al., 1989), gefolgt von Hybridisierung in der gleichen Lösung, die 10 ng/ml einer statistisch geprägten (Feinberg, A.P., und Vogelstein, B. (1983), *Anal. Biochem.* 132:6-13), <sup>32</sup>P-dCTP-markierten (spezifische Aktivität > 1 x 10<sup>9</sup> CpM/µg) Sonde enthält, für 12 Stunden bei etwa 45° C.
- 25 Der Filter wird dann zweimal 30 Minuten lang in 2 x SSC, 0,5 % SDS, bei einer Temperatur von mindestens 55° C (niedrige Stringenz), bevorzugter mindestens 60° C (mittlere Stringenz), noch bevorzugter mindestens 65° C (mittlere/hohe Stringenz), noch bevorzugter mindestens 70° C (hohe Stringenz) und noch bevorzugter mindestens 75° C (sehr hohe Stringenz) gewaschen.
- 30

Moleküle, mit denen die Oligonukleotid-Sonde unter diesen Bedingungen hybridisiert, werden mit Hilfe eines Röntgenfilms nachgewiesen.

- 5 Es wurde festgestellt, daß es möglich ist, theoretisch vorausszusagen, ob zwei gegebene DNA-Sequenzen unter bestimmten spezifizierten Bedingungen hybridisieren werden oder nicht.

- 10 Dementsprechend kann als Alternative zu dem oben beschriebenen experimentellen Verfahren die Feststellung, ob eine analoge DNA-Sequenz mit der oben beschriebenen Nukleotid-Sonde hybridisieren wird oder nicht, auf einer theoretischen Berechnung der  $T_m$  (Schmelztemperatur) basieren, bei der zwei heterologe DNA-Sequenzen mit bekannten Sequenzen unter spezifizierten Bedingungen (z.B. hinsichtlich der Kationenkonzentration und Temperatur) hybridisieren werden.
- 15

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur für heterologe DNA-Sequenzen ( $T_m(\text{Hetero})$ ) ist es erforderlich, zuerst die Schmelztemperatur ( $T_m(\text{Homo})$ ) für homologe DNA-Sequenzen zu bestimmen.

20

Die Schmelztemperatur ( $T_m(\text{Homo})$ ) von zwei vollständig komplementären DNA-Strängen (Homoduplexbildung) kann mit Hilfe der folgenden Formel

- $$T_m(\text{Homo}) = 81,5^\circ \text{ C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{GC}) - 0,61 (\% \text{Form}) - 500/L$$
- 25 ("Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995) bestimmt werden, worin

- "M": die molare Kationenkonzentration in Waschpuffer,  
 "%GC": % Guanin (G) und Cytosin (C) der Gesamtzahl an Basen in  
 der DNA-Sequenz,  
 "% Form": % Formamid im Waschpuffer und  
 5 "L": die Länge der DNA-Sequenz angibt.

Unter Verwendung dieser Formel und den oben angegebenen experimentellen  
 Waschbedingungen beträgt  $T_m(\text{Homo})$  für die Homoduplexbildung der Nukleo-  
 tid-Sonde, die der in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz entspricht, d.h.,  
 10 den Nukleotiden 23-1060:

$$T_m(\text{Homo}) = 81,5 + 16,6 (\log 0,30) + 0,41(56) - 0,61(0) - (500/1038)$$

$$T_m(\text{Homo}) = 103,5^\circ \text{ C.}$$

- 15 "M": 2 X SSC entspricht einer Kationenkonzentration von 0,3 M.  
 "%GC": Der Prozentsatz an GC in SEQ-ID-Nr. 1, Pos. 23-1060, be-  
 trägt 56 %.  
 "% Form": Es liegt kein Formamid im Waschpuffer vor.  
 "L": Die Länge der SEQ-ID-Nr. 1, Pos. 23-1063 beträgt 1038 bp.

20 Die mit der obigen Formel bestimmte  $T_m$  ist die  $T_m$  einer Homoduplexbildung  
 ( $T_m(\text{Homo})$ ) zwischen zwei vollständig komplementären DNA-Sequenzen. Um  
 den  $T_m$ -Wert an denjenigen von zwei heterologen DNA-Sequenzen anzupassen,  
 wird angenommen, daß ein Unterschied von 1 % in der Nukleotidsequenz zwi-  
 25 schen den beiden heterologen Sequenzen einer Herabsetzung der  $T_m$  um 1 %  
 gleichkommt ("Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons,  
 1995). Deshalb wird die  $T_m(\text{Hetero})$  für die Heteroduplexbildung gefunden, in-  
 dem der prozentuale Homologieunterschied zwischen der fraglichen analogen  
 Sequenz und der oben beschriebenen Nukleotid-Sonde von der  $T_m(\text{Homo})$  sub-

trahiert wird. Der zu subtrahierende DNA-Homologie-Prozentsatz wird wie hier beschrieben berechnet (siehe oben).

### Homologie zu Aminosäuresequenzen

5

Die oben angesprochene Polypeptidhomologie wird bestimmt als der Identitätsgrad zwischen zwei Sequenzen, welcher eine Abweichung der ersten Sequenz von der zweiten anzeigt. Die Homologie kann geeigneterweise mit Hilfe von im Stand der Technik bekannten Computerprogrammen bestimmt werden, wie z.B. GAP, das in dem GCG-Programmpaket (Program Manual for the Wisconsin Package, 10 Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., und Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453) zur Verfügung steht. Bei Anwendung von GAP mit den folgenden Einstellungen für den Polypeptidsequenzvergleich: GAP-15 Erstellungslimit von 3,0 und GAP-Extensionslimit von 0,1, zeigt der reife Teil eines Polypeptids, der von einer analogen DNA-Sequenz kodiert wird, einen Grad der Identität von vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, insbesondere mindestens 97 % mit dem reifen Teil der in SEQ-ID-Nr. 2 dargestellten Aminosäuresequenz, d.h., Position 31-346 in SEQ-ID-Nr. 2, oder bevorzugter mit der in Position 31-303 von SEQ-ID-Nr. 2 dargestellten Aminosäuresequenz (Position 303 ist 20 der C-terminale Rest in C-terminal prozessiertem sekretiertem aktivem Enzym).

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Phospholipase-Varianten mit einer Aminosäuresequenz, die sich um nicht mehr als drei Aminosäuren, vorzugsweise nicht 25 mehr als zwei Aminosäuren und bevorzugter nicht mehr als eine Aminosäure, von dem reifen Teil der in SEQ-ID-Nr. 2 angegebenen Aminosäuresequenz unterscheidet.

- Ferner betreffen die obengenannten bevorzugten Aminosäure-Identitäten auch ein Analogon einer klonierten DNA-Sequenz der Erfindung, wobei die Sequenz für ein Polypeptid kodiert, das Phospholipase-Aktivität zeigt und welches mindestens zu 70 % homolog zu der Polypeptidsequenz ist, die in den Positionen 31-346 von
- 5 SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt ist, oder bevorzugter mindestens zu 70 % homolog zu der Polypeptidsequenz, welche die Positionen 31-303 von SEQ-ID-Nr. 2 umfaßt.

#### Immunologische Kreuzreaktivität

- 10 Antikörper zur Verwendung bei der Bestimmung von immunologischer Kreuzreaktivität können unter Verwendung einer gereinigten Phospholipase hergestellt werden. Konkreter kann Antiserum gegen die Phospholipase der Erfindung durch Immunisierung von Kaninchen (oder anderen Nagetieren) gemäß dem von N. Axelsen et al. in „A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis“, Blackwell
- 15 Scientific Publications, 1973, Kapitel 23, oder A. Johnstone und R. Thorpe, Immunochimistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982, (konkreter S. 27-31) beschriebenen Verfahren gebildet werden. Gereinigte Immunglobuline können aus dem erhaltenen Antiserum erhalten werden, beispielsweise durch Salzpräzipitation ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), gefolgt von Dialyse und Ionenaustauschchromatographie, z.B. mit DEAE-Sephadex. Eine immun-chemische Charakterisierung von
- 20 Proteinen kann entweder durch eine Ouchterlony-Doppelimmundiffusions-Analyse (O. Ouchterlony in: „Handbook of Experimental Immunology“ (D.M. Weir, Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, 1967, S. 655-706), durch Kreuzimmunelektrophorese (N. Axelsen et al., supra, Kapitel 3 und 4) oder durch
- 25 "Rocket"-Immunelektrophorese (N. Axelsen et al., Kapitel 2) durchgeführt werden.

### Mikrobielle Quellen

Zum Prioritätsdatum der vorliegenden Erfindung entspricht die im folgenden angewandte Taxonomie dem World Wide Web (WWW) NCBI-Taxonomie-Browser.

Ein isoliertes Polypeptid mit Phospholipase-Aktivität und die entsprechende klonierte DNA-Sequenz der Erfindung können aus irgendeinem Mikroorganismus, vorzugsweise einem Fadenpilz, einer Hefezelle oder einem Bakterium, erhalten werden.

Vorzugsweise können eine Phospholipase und die entsprechende klonierte DNA-Sequenz der Erfindung aus einem Fadenpilz-Stamm erhalten werden, wobei ein bevorzugter Phylum *Ascomycota* ist, worin eine bevorzugte Klasse *Pyrenomyces* ist, welche die bevorzugte Familie *Nectriaceae* umfaßt.

Bevorzugter können die Phospholipase und die entsprechende klonierte DNA-Sequenz der Erfindung aus einem Stamm der Gattung *Fusarium* erhalten werden, wie z.B. einem Stamm von *F. culmorum*, *F. heterosporum* oder *F. solani*, insbesondere einem Stamm von *Fusarium oxysporum*.

Darüber hinaus können eine Phospholipase und die entsprechende klonierte DNA-Sequenz der Erfindung aus einem Fadenpilz-Stamm innerhalb der Gattung *Aspergillus* erhalten werden, wie z.B. einem Stamm von *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* oder insbesondere *Aspergillus oryzae*.

Ein Isolat eines Stammes von *Fusarium oxysporum*, aus dem eine Phospholipase der Erfindung erhalten werden kann, wurde gemäß dem Budapester Vertrag hinsichtlich der internationalen Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke eines Patenterteilungsverfahrens bei der Deutschen  
5 Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, (DSM) hinterlegt.

Hinterlegungsdatum : 6. Juni 1983  
Aktenzeichen des Hinterlegers : NN041759  
10 DMS-Nr. : *Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672

Darüber hinaus wurde das Expressionsplasmid pYES 2.0, umfassend die vollständige cDNA-Sequenz, welche für die Phospholipase der Erfindung kodiert, in einen Stamm von *Escherichia coli* transformiert, welcher gemäß dem Budapester  
15 Vertrag hinsichtlich der internationalen Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke eines Patenterteilungsverfahrens bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, (DSM) hinterlegt wurde:

20 Hinterlegungsdatum : 25. November 1996  
Aktenzeichen des Hinterlegers : NN049279  
DSM-Nr. : *Escherichia coli* DSM-Nr. 11299

#### Expressionsvektoren

25

Der Expressionsvektor der Erfindung kann irgendein Expressionsvektor sein, welcher günstig rekombinanten DNA-Verfahren unterworfen wird, und die Wahl des Vektors wird oft von der Wirtszelle abhängen, in die der Vektor eingeführt



werden soll. So kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor sein, d.h., ein Vektor, der als extrachromosomale Entität vorliegt, deren Replikation unabhängig von der chromosomalen Replikation ist, z.B. ein Plasmid. Alternativ kann der Vektor einer sein, welcher bei Einführung in eine Wirtszelle in das Genom der Wirtszelle integriert wird und zusammen mit dem Chromosom oder den Chromosomen, in das/die er integriert wurde, repliziert wird.

In dem Expressionsvektor sollte die DNA-Sequenz, welche für die Phospholipase kodiert, funktionsfähig mit einer geeigneten Promotor- und Terminatorsequenz verknüpft sein. Der Promotor kann jede DNA-Sequenz sein, welche transkriptionale Aktivität in der Wirtszelle der Wahl zeigt, und kann von Genen stammen, die für Proteine kodieren, welche für die Wirtszelle entweder homolog oder heterolog sind. Die zur Ligierung der für die Phospholipase, den Promotor und den Terminator kodierenden DNA-Sequenzen und zu deren Einführung in geeignete Vektoren eingesetzten Verfahren sind Fachleuten wohlbekannt (vgl. z.B. Sambrook et al., (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY).

Beispiele geeigneter Promotoren zur Verwendung in Fadenpilz-Wirtszellen sind beispielsweise der ADH3-Promotor (*McKnight et al., The EMBO J.* 4 (1985), 2093-2099) oder der tpiA-Promotor. Beispiele anderer geeigneter Promotoren sind diejenigen, welche sich von dem Gen ableiten, welches für TAKA-Amylase von *Aspergillus oryzae*, Asparaginsäure-Proteinase von *Rhizomucor miehei*, neutrale  $\alpha$ -Amylase von *Aspergillus niger*, säurestabile  $\alpha$ -Amylase von *Aspergillus niger*, Glucoamylase (*gluA*) von *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori*, *Rhizomucor miehei*-Lipase, alkalische *Aspergillus oryzae*-Protease, Triosephosphatisomerase von *Aspergillus oryzae* oder Acetamidase von *Aspergillus nidulans* kodiert.

## Wirtszellen

Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Wirtszellen, umfassend eine Nukleinsäuresequenz der Erfindung, welche Zellen vorteilhafterweise bei der rekombinanten Herstellung der Polypeptide eingesetzt werden können. Der Begriff "Wirtszelle" umfaßt jede Nachkommenschaft einer Stammzelle, welche aufgrund von Mutationen, die während der Replikation stattfinden, nicht identisch mit der Stammzelle ist.

- 10 Die Zelle wird vorzugsweise mit einem Vektor transformiert, welcher eine Nukleinsäuresequenz der Erfindung umfaßt, gefolgt von Integration des Vektors in das Wirtsgenom.

"Transformation" bedeutet die Einführung eines Vektors, der eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung umfaßt, in eine Wirtszelle, so daß der Vektor in das Chromosom integriert oder als selbstreplizierender extrachromosomaler Vektor aufrechterhalten wird. Die Integration wird im allgemeinen als Vorteil betrachtet, da die Nukleinsäuresequenz wahrscheinlicher stabil in der Zelle aufrechterhalten wird. Die Integration des Vektors in das Wirtschromosom kann durch homologe oder nicht-homologe Rekombination wie oben beschrieben erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Wirtszelle eine Pilzzelle. "Pilze", wie hier verwendet, schließen die Phylae *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* und *Zygomycota* (wie von Hawksworth *et al.* in „*Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, 8. Auflage, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK, definiert) ebenso wie die *Oomycota* (wie in Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, Seite 171 zitiert) und alle mitosporischen Pilze (Hawksworth

et al., 1995, supra) ein. Repräsentative Gruppen von *Ascomycota* umfassen beispielsweise *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) und die oben aufgeführten echten Hefen. Beispiele von *Basidiomycota* umfassen Ständerpilze, Rostpilze und Schleimpilze. Repräsentative Gruppen von *Chytridiomycota* umfassen beispielsweise *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* und Wasserpilze. Repräsentative Gruppen von *Oomycota* umfassen beispielsweise saprolegniomycetische Wasserpilze (Wasserschleimpilze), z.B. *Achlya*. Beispiele mitosporeischer Pilze schließen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* und *Alternaria* ein. Repräsentative Gruppen von *Zygomycota* umfassen beispielsweise *Rhizopus* und *Mucor*.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Pilz-Wirtszelle eine Fadenpilzzelle. "Fadenpilze" umfassen alle filamentösen Formen der Unterabteilung *Eumycota* und *Oomycota* (wie von Hawksworth et al., 1995, supra, definiert). Die Fadenpilze sind gekennzeichnet durch ein vegetatives Myzel, das aus Chitin, Cellulose, Glucan, Chitosan, Mannan und anderen komplexen Polysacchariden aufgebaut ist. Das vegetative Wachstum erfolgt durch Hyphen-Verlängerung und der Kohlenstoffkatabolismus ist obligat aerob. Im Gegensatz dazu erfolgt das vegetative Wachstum von Hefen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, durch Knospung eines unizellulären Thallus und der Kohlenstoffkatabolismus kann fermentativ sein. In einer bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine Zelle einer Spezies von, jedoch nicht beschränkt auf, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolytocladium* und *Trichoderma* oder ein Teleomorph oder Synonym davon. In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Aspergillus*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Acremonium*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Fusarium*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Humicola*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die

- Fadenpilz-Wirtszelle eine *Mucor*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Myceliophthora*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Neurospora*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die
- 5 Fadenpilz-Wirtszelle eine *Penicillium*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Thielavia*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Tolytocladium*-Zelle. In einer weiteren noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Trichoderma*-Zelle. In einer besonders bevorzugten
- 10 Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine Zelle von *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* oder *Aspergillus oryzae*. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Fusarium*-Zelle der Abteilung Discolor (auch bekannt als Sektion *Fusarium*). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Fa-
- 15 denpilz-Wirtszelle ein *Fusarium*-Stamm der Sektion *Elegans*, z.B. *Fusarium oxysporum*. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine Zelle von *Humicola insolens* oder *Thermomyces lanuginosa*. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine *Rhizomucor miehei*-Zelle. In einer weiteren besonders bevorzug-
- 20 ten Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine Zelle von *Myceliophthora thermophilum*. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine Zelle von *Neurospora crassa*. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine Zelle von *Penicillium purpurogenum*. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausfüh-
- 25 rungsform ist die Fadenpilz-Wirtszelle eine Zelle von *Thielavia terrestris*. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist die *Trichoderma*-Zelle eine Zelle von *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* oder *Trichoderma viride*.

- Pilzzellen können durch einen Prozeß transformiert werden, welcher Protoplastenbildung, Transformation der Protoplasten und Regeneration der Zellwand in an sich bekannter Weise beinhaltet. Geeignete Verfahren zur Transformation von *Aspergillus*-Wirtszellen werden in EP 238 023 und Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81:1470-1474, beschrieben. Ein
- 5 geeignetes Verfahren zur Transformation von *Fusarium*-Spezies wird von Malar-dier *et al.*, 1989, *Gene* 78:147-156, oder in der parallel anhängigen US-Serien-Nr. 08/269,449 beschrieben. Hefen können transformiert werden unter Anwendung der Verfahren, die von Becker und Guarente in Abelson, J.N., und Simon, M.I.,
- 10 Herausgeber, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Methods in Enzy-mology, Bd. 194, S. 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153-163; und Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:1920, beschrieben werden. Säugerzellen können durch direkte Aufnahme unter Anwendung des Calciumphosphat-
- 15 Präzipitationsverfahrens von Graham und Van der Eb (1978, *Virology* 52:546) transformiert werden.

#### Verfahren zur Herstellung von Phospholipase

- 20 Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit zur Herstellung eines iso-lierten Enzyms gemäß der Erfindung, worin eine geeignete Wirtszelle, die mit einer für das Enzym kodierenden DNA-Sequenz transformiert wurde, unter Be-dingungen kultiviert wird, welche die Produktion des Enzyms erlauben, und das resultierende Enzym aus der Kultur gewonnen wird.

25

Wenn ein Expressionsvektor, der eine für das Enzym kodierende DNA-Sequenz umfaßt, in eine heterologe Wirtszelle transformiert wird, ist es möglich, die he-terologe rekombinante Produktion des Enzyms der Erfindung zu ermöglichen.

Damit ist es möglich, eine hochgereinigte Phospholipase-Zusammensetzung zu erhalten, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie frei von homologen Verunreinigungen ist.

5

In der vorliegenden Erfindung kann die homologe Wirtszelle ein Stamm von *Fusarium oxysporum* sein.

Das zur Kultivierung der transformierten Wirtszellen verwendete Medium kann  
10 irgendein herkömmliches Medium sein, das sich zur Züchtung der fraglichen Wirtszellen eignet. Die exprimierte Phospholipase kann vorteilhafterweise in das Kulturmedium sekretiert werden und kann daraus mit wohlbekannten Verfahren, einschließlich der Abtrennung der Zellen von dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration, Präzipitation proteinhaltiger Komponenten aus dem Medium mit  
15 Hilfe eines Salzes wie Ammoniumsulfat, gefolgt von chromatographischen Verfahren wie Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder dgl., gewonnen werden.

#### Einsatz von Phospholipase

20

Neben dem Einsatz einer Phospholipase in einem neuen Verfahren der Erfindung zur enzymatischen Degummierung eines Speiseöls, das einen hohen Gehalt an nicht-hydratisierbarem Phosphor enthält, ist eine Reihe anderer Anwendungen von Phospholipasen im Stand der Technik bekannt.

25

Solche im Stand der Technik bekannten Verwendungen/Anwendungen von Phospholipasen sind im folgenden beschrieben.

Die Phospholipase der Erfindung kann in irgendeiner Anwendung eingesetzt werden, in der es erwünscht ist, die Fett-Acylgruppe(n) eines Phospholipids oder Lysophospholipids, z.B. Lecithin oder Lysolecithin, zu hydrolysieren. Die Phospholipase wird vorzugsweise bei pH 3-10 und bei 30-70° C (insbesondere 40-60° C) eingesetzt. Gewünschtenfalls kann die Phospholipase nach der Reaktion inaktiviert werden, indem sie einer Hitzebehandlung, z.B. bei pH 7, 80° C für eine Stunde oder 90° C für 10 Minuten, ausgesetzt wird.

Als Beispiel kann die Phospholipase der Erfindung zur Herstellung von Teig, Brot und Kuchen eingesetzt werden, beispielsweise zur Verbesserung der Elastizität des Brots oder Kuchens. So kann die Phospholipase in einem Verfahren zur Brotherstellung eingesetzt werden, welches die Zugabe der Phospholipase zu den Bestandteilen eines Teigs, das Kneten des Teigs und das Backen des Teigs zur Herstellung des Brots umfaßt. Dies kann analog zu US 4,567,046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) oder EP 426211 (Unilever) erfolgen.

Die Phospholipase der Erfindung kann auch zur Verbesserung der Filtrierbarkeit einer wäßrigen Lösung oder Aufschlämmung, die von Kohlenhydraten herrührt, eingesetzt werden, indem diese mit der Phospholipase behandelt wird. Dies läßt sich besonders auf eine Lösung oder Aufschlämmung anwenden, die ein Stärkehydrolysat enthält, insbesondere ein Weizenstärkehydrolysat, da dieses dazu neigt, schwer filtrierbar zu sein und trübe Filtrate zu ergeben. Die Behandlung kann analog zu EP 219,269 (CPC International) erfolgen.

25

Ferner kann eine Phospholipase der Erfindung zur partiellen Hydrolyse von Phospholipiden, vorzugsweise Lecithin, eingesetzt werden, um verbesserte Phospholipid-Emulgatoren zu erhalten. Diese Anwendung wird näher beschrieben in Produktbeschreibungen für Lecitase<sup>TM</sup> (Novo Nordisk A/S), die sich auf diese Ver-

wendung beziehen, und in Ullmann's Enzyklopädie der industriellen Chemie (Verlag: VCH Weinheim (1996)).

5 Ferner kann eine Phospholipase der Erfindung in einem Verfahren zur Produktion eines Tierfutters eingesetzt werden, welches das Mischen der Phospholipase mit Futtersubstanzen und mindestens einem Phospholipid umfaßt. Dies kann analog zu EP 743 017 erfolgen.

#### 10 Degummierung von Pflanzenölen/Speiseölen gemäß im Stand der Technik bekannten Verfahren

Gemäß im Stand der Technik bekannten Verfahren kann die Phospholipase der Erfindung in einem Verfahren zur Verringerung des Gehalts an Phospholipid in einem Speiseöl eingesetzt werden, welches die Behandlung des Öls mit der Phospholipase, um einen Großteil des Phospholipids zu hydrolysieren, und das Ab-  
15 trennen einer wäßrigen Phase, die das hydrolysierte Phospholipid enthält, von dem Öl umfaßt. Dieses Verfahren ist auf die Reinigung von jeglichem Speiseöl anwendbar, welches Phospholipid enthält, z.B. Pflanzenöl wie Sojabohnenöl, Rapsöl und Sonnenblumenöl.

20 Vor der enzymatischen Behandlung wird das Pflanzenöl vorzugsweise vorbehandelt, um Schleim (Mucilago) zu entfernen, z.B. durch Naßraffinerung. Typischerweise wird das Öl zu Beginn der Behandlung mit Phospholipase 50-250 ppm Phosphor als Phospholipid enthalten und das Verfahren der Erfindung kann diesen  
25 Wert auf unter 11 ppm, bevorzugter unter 5 ppm, verringern.

Die enzymatische Behandlung wird durchgeführt durch Dispersion einer wäßrigen Lösung der Phospholipase, vorzugsweise als Tröpfchen mit einem mittleren Durchmesser von weniger als 10 µm (Mikrometer). Die Menge an Wasser beträgt



vorzugsweise 0,5-5 Gewichtsprozent, bezogen auf das Öl. Ein Emulgator kann gegebenenfalls zugesetzt werden. Es kann mechanische Bewegung eingesetzt werden, um die Emulsion aufrechtzuerhalten.

- 5 Die enzymatische Behandlung kann bei irgendeinem pH-Wert im Bereich von 1,5-8 durchgeführt werden. Der pH-Wert kann durch Zugabe von Citronensäure, einem Citrat-Puffer oder HCl eingestellt werden.

Eine geeignete Temperatur beträgt gewöhnlich 30-70° C (insbesondere 40-60° C).

- 10 Die Reaktionszeit wird typischerweise 0,5-12 Stunden (z.B. 2-6 Stunden) betragen und eine geeignete Enzymdosis wird gewöhnlich 100-5000 IE pro Liter Öl, vorzugsweise 200-2000 IE/l, betragen.

Die enzymatische Behandlung kann diskontinuierlich, z.B. in einem Tank unter

- 15 Rühren, durchgeführt werden oder kontinuierlich sein, z.B. eine Reihe von gerührten Tankreaktoren.

Der enzymatischen Behandlung folgt die Abtrennung einer wäßrigen Phase und einer Ölphase. Diese Trennung kann durch herkömmliche Mittel, z.B. Zentrifuga-

- 20 tion, erfolgen.

In anderen Aspekten kann das Verfahren gemäß im Stand der Technik bekannten Prinzipien durchgeführt werden, z.B. in Analogie zu US 5,264,367 (Metallgesellschaft, Röhlm), K. Dahlke & H. Buchold, INFORM, 6 (12), 1284-91 (1995); H.

- 25 Buchold, Fat Sci. Technol., 95 (8), 300-304 (1993), JP-A 2-153997 (Showa Sanyo) oder EP 654,527 (Metallgesellschaft, Röhlm).

### Verwendung einer Phospholipase der Erfindung beim Backen

Die Phospholipase der Erfindung kann auch in brotverbessernden Zusätzen, z.B. Teigzusammensetzungen, Teigadditiven, Teig-Conditionern, Vormischungen und  
5 ähnlichen Zubereitungen eingesetzt werden, die herkömmlicherweise dem Mehl und/oder dem Teig während Verfahren zur Herstellung von Brot oder anderen Backprodukten zugesetzt werden, um verbesserte Eigenschaften des Brots oder der anderen Backprodukte zu ergeben.

10 Demgemäß betrifft eine Ausführungsform der Erfindung eine brotverbessernde und/oder eine teigverbessernde Zusammensetzung und ferner die Verwendung einer Phospholipase der Erfindung in solchen Zusammensetzungen und einen Teig oder ein Backprodukt, umfassend eine brotverbessernde und/oder eine teigverbessernde Zusammensetzung der Erfindung.

15

Im vorliegenden Kontext sollen die Begriffe "brotverbessernde Zusammensetzung" und "teigverbessernde Zusammensetzung" Zusammen-setzungen bezeichnen, welche neben der Enzymkomponente andere Substanzen umfassen können, die herkömmlicherweise beim Backen eingesetzt werden, um die Eigenschaften  
20 von Teig und/oder Backprodukten zu verbessern. Beispiele solcher Komponenten werden im folgenden angegeben.

Im vorliegenden Kontext soll der Begriff "verbesserte Eigenschaften" jede Eigenschaft bezeichnen, welche durch die Wirkung eines Phospholipase-Enzyms der  
25 Erfindung verbessert werden kann. Insbesondere führt die Verwendung von Phospholipase zu einem erhöhten Volumen und einer verbesserten Krumenstruktur und dem Altbackenwerden entgegenwirkenden Eigenschaften des Backprodukts sowie zu erhöhter Festigkeit, Stabilität und verringerter Klebrigkeit und dadurch

verbesserter Verarbeitungsfähigkeit des Teigs. Die Wirkung auf den Teig wurde als besonders gut befunden, wenn ein Mehl schlechter Qualität verwendet wurde. Die verbesserte Verarbeitungsfähigkeit ist von besonderer Bedeutung in Verbindung mit Teig, der industriell verarbeitet werden soll.

5

Die verbesserten Eigenschaften werden durch Vergleich mit Teig und/oder Backprodukten, der/die ohne Zugabe von Phospholipase gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde(n), beurteilt.

- 10 Die brotverbessernde und/oder teigverbessernde Zusammensetzung der Erfindung kann ferner ein weiteres Enzym umfassen. Beispiele anderer Enzyme sind eine Cellulase, eine Hemicellulase, eine Pentosanase (geeignet zur partiellen Hydrolyse von Pentosanen, welche die Dehnbarkeit des Teigs erhöht), eine Glucoseoxidase (geeignet zur Festigung des Teigs), eine Lipase (geeignet zur Modifizierung
- 15 von Lipiden, die in dem Teig oder den Teigbestandteilen vorliegen, um den Teig locker zu machen), eine Peroxidase (geeignet zur Verbesserung der Teigkonsistenz), eine Protease (geeignet zur Gluten-Abschwächung, insbesondere beim Einsatz von Hartweizenmehl), eine Peptidase und/oder eine Amylase, z.B. eine  $\alpha$ -Amylase (geeignet zur Bereitstellung von Zuckern, die durch Hefe fermentierbar
- 20 sind).

Zusätzlich oder als Alternative zu anderen Enzymkomponenten kann die teigverbessernde und/oder brotverbessernde Zusammensetzung ein herkömmlicherweise verwendetes Backmittel, z.B. einen oder mehrere der folgenden Bestand-

25 teile, umfassen:

ein Milchpulver (sorgt für die Farbe der Rinde), Gluten (zur Verbesserung des Gasrückhaltevermögens von kleberarmen Mehlen), ein Emulgator (zur Verbesserung der Dehnbarkeit des Teigs und bis zu einem gewissen Grad

30 der Konsistenz des resultierenden Brotes), granuliertes Fett (für die Locke-

5        rung des Teigs und Konsistenz des Brotes), ein Oxidationsmittel (zur Festigung der Gluten-Struktur zugesetzt, z.B. Ascorbinsäure, Kalium-bromat, Kaliumiodat oder Ammoniumpersulfat), eine Aminosäure (z.B. Cystein), ein Zucker und Salz (z.B. Natriumchlorid, Calciumacetat, Natriumsulfat oder Calciumsulfat, um den Teig fester zu machen), Mehl oder Stärke.

10        Beispiele geeigneter Emulgatoren sind Mono- oder Diglyceride, Diacetylweinsäureester von Mono- oder Diglyceriden, Zuckerester von Fettsäuren, Polyglycerinester von Fettsäuren, Milchsäureester von Monoglyceriden, Essigsäureester von Monoglyceriden, Polyoxyethylenstearate, Phospholipide und Lecithin.

15        Im vorliegenden Kontext soll der Begriff "Backprodukt" jedes aus Teig hergestellte Produkt umfassen, sowohl weichen als auch krossen Charakters. Beispiele von Backprodukten, sei es weißen, hellen oder dunklen Typs, welche vorteilhafterweise mit der vorliegenden Erfindung hergestellt werden können, sind Brot (insbesondere Weißbrot, Vollkorn- oder Roggenbrot), typischerweise in Form von Laiben oder Brötchen, Brot vom Typ eines französischen Baguettes, Pitabrot, Tacos, Kuchen, Pfannkuchen, Biskuits, Knäckebrot und dgl.

20        Der Teig der Erfindung kann irgend einer der oben erörterten Typen sein und kann frisch oder eingefroren sein.

25        Aus der obigen Offenbarung wird ersichtlich sein, daß der Teig der Erfindung normalerweise ein aufgegangener Teig ist oder ein Teig der zum Aufgehen gebracht werden soll. Der Teig kann auf verschiedene Weise, wie z.B. durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat oder dgl. oder durch Zugabe eines treibenden Teigs (fermentierenden Teigs) zum Aufgehen gebracht werden, es ist jedoch bevorzugt, daß der Teig durch die Zugabe einer geeigneten Hefekultur, z.B. einer

Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe), zum Aufgehen gebracht wird. Es können beliebige der im Handel erhältlichen *S. cerevisiae*-Stämme eingesetzt werden.

- 5 In einer letzten Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung einer Phospholipase der Erfindung zur Herstellung von Nudelteig, vorzugsweise hergestellt aus Hartweizenmehl oder einem Mehl vergleichbarer Qualität. Der Teig kann mit Hilfe herkömmlicher Techniken hergestellt werden und die Phospholipase in einer ähnlichen Dosis wie oben beschrieben verwendet werden. Die Phospholipase ist vorzugsweise mikrobiellen Ursprungs, wie z.B hier offenbart. Es wird davon ausgegangen, daß bei der Verwendung bei der Herstellung von Nudeln die Phospholipase zu einer Festigung der Gluten-Struktur und somit einer Verringerung der Teigklebrigkeit und einer erhöhten Teigfestigkeit führt.

15 **Verwendung von Lipase-Aktivität eines Enzyms der Erfindung**

Wie hier in den Arbeitsbeispielen gezeigt, kann eine Phospholipase der Erfindung ferner Lipase-Aktivität aufweisen.

- 20 Demgemäß betrifft die Erfindung ferner die Verwendung dieser Lipase-Aktivität in Standardverwendungen einer Lipase, insbesondere zur Verwendung in Reinigungs- und Detergens-Zusammensetzungen. Solche Reinigungs- und Detergens-Zusammensetzungen sind im Stand der Technik gut beschrieben und hinsichtlich einer näheren Beschreibung geeigneter Reinigungs- und Detergens-
- 25 Zusammensetzungen wird auf WO 96/34946, WO 97/07202 und WO 95/30011 verwiesen.

Die Erfindung wird detaillierter in den folgenden Beispielen beschrieben, welche den Umfang der beanspruchten Erfindung in keiner Weise beschränken sollen.

## MATERIALIEN UND METHODEN

## Hinterlegte Organismen:

- 5 *Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672 umfaßt die für Phospholipase kodierende DNA-Sequenz der Erfindung.

- 10 *Escherichia coli* DSM 11299, enthaltend das Plasmid, welches die für die Phospholipase der Erfindung kodierende cDNA-Sequenz vollständiger Länge umfaßt, in dem Shuttle-Vektor pYES 2.0.

## Andere Stämme:

- 15 Hefestamm: Der verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm war W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prcl::HIS3; prbl::LEU2; cir+).

*E. coli*-Stamm: DH10B (Life Technologies)

- 20 Plasmide:

Der *Aspergillus*-Expressionsvektor pHD414 ist ein Derivat des Plasmids p775 (beschrieben in EP 238 023). Die Konstruktion von pHD414 wird in WO 93/11249 näher beschrieben.

25

pYES 2.0 (Invitrogen)

pA2PH10 (siehe Beispiel 7)

### Allgemeine molekularbiologische Methoden

5

Soweit nicht anders angegeben, wurden die DNA-Manipulationen und -Transformationen gemäß Standardverfahren der Molekularbiologie durchgeführt (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (Hrsg.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R., und Cutting, S.M. (Hrsg.) "Molecular Biological Methods for Bacillus", John Wiley and Sons, 1990).

15 Enzyme für DNA-Manipulationen wurden gemäß den Angaben der Hersteller eingesetzt.

### Enzyme für DNA-Manipulationen

20 Soweit nicht anders angegeben, werden alle Enzyme für DNA-Manipulationen, z.B. Restriktionsendonukleasen, Ligasen etc., von New England Biolabs, Inc. erhalten.

### Phospholipase-Aktivitäts-Assay auf Grundlage des NEFA-C-Tests:

25 Substrat: L-  $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin (Sigma)

Substrat: Sojabohnen-Lecithin (Sigma #P3644), verwendet zur Bestimmung der Phospholipase A-Aktivität

Der Nefa-C-Testkit stammt von Wako Chemicals, Deutschland.

Puffer: 20 mM NaOAc, pH 4,5

5

Substratlösung: 10 mg Substrat in 1 ml Milli-Q-Wasser und 1 ml Puffer (Herstellung von genug Substratlösung für alle Proben)

1. 15 µl Enzym werden zu 150 µl Substratlösung zugegeben
- 10 2. Inkubation für 10 Min. bei 40° C
3. 30 µl werden zu 300 µl Reagens 1 (aus dem Nefa-Kit) überführt
4. Inkubation für 10 Min. bei 37° C
5. Zugabe von 600 µl Reagens 2 (aus dem Nefa-Kit)
6. Inkubation für 10 Min. bei 37° C
- 15 7. Die Extinktion des endgültigen Reaktionsprodukts wird bei 550 nm gemäß den Instruktionen des Nefa-Kits gemessen.

Die erforderliche Enzym-Aktivität, um 1 µMol Fettsäure pro Minute der Enzymreaktion zu ergeben, wurde als 1 Einheit definiert.

20

### Expressionsklonierung in Hefe

Die Expressionsklonierung in Hefe wurde durchgeführt wie umfassend beschrieben von H. Dalboege et al. (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260; WO 93/11249; WO 94/14953), hier durch die Bezugnahme mit eingeschlossen.

25



Alle individuellen Schritte der Extraktion von Gesamt-RNA, cDNA-Synthese, Mungobohnennuklease-Behandlung, Glattendigmachen mit T4-DNA-Polymerase und Erstellung von Banken erfolgte gemäß den oben angegebenen Literaturstellen.

5

**Fermentationsverfahren für *Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672 zur mRNA-Isolierung:**

*Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672 wurde in YPD-Medium 4 Tage bei 30° C kultiviert. 10 µl Überstand wurden in dem im folgenden beschriebenen Platten-Assay auf Phospholipase-Aktivität getestet.

mRNA wurde aus Myzel von dieser Kultur isoliert wie in H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260, WO 93/11249 und WO 94/14953, beschrieben.

15 **Identifizierung positiver Hefeklone (Platten-Assay):**

Die Identifizierung positiver Hefeklone (d.h., Klone, welche ein Gen umfassen, das für Phospholipase-Aktivität kodiert) wurde wie im folgenden beschrieben durchgeführt.

20

Die Hefe-Transformanten werden auf SC-Agar, enthaltend 2 % Glucose, ausplattiert und 3 Tage lang bei 30° C inkubiert. Ein Celluloseacetat-Filter (OE67, Schleicher & Schuell) wird auf die Zellen gelegt und dann mit den Zellen auf dem Filter auf die Platten überführt, die SC-Agar und 2 % Galactose enthalten. Nach 25 3 Tagen Inkubation bei 30° C wird der Filter mit Zellen auf Substratplatten überführt. Positive Klone werden als Kolonien identifiziert, die in der Substratplatte unter der Kolonie eine blaugüne Zone ergeben.

- Die Substratplatten werden auf folgende Weise hergestellt: 2,5 g Agar (BA-30 RNA Agar®, Funakoshi Co. Ltd.) werden zu 137,5 ml H<sub>2</sub>O zugegeben, das in einem Mikrowellenofen bis zum Sieden erwärmt wurde. Nach Abkühlen auf etwa 60° C werden 30 ml der folgenden Mischung zugegeben: 62,5 ml 0,4 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) und 50 ml 3%iges Lipoid E80 (Lipoid GmbH, D-67065 Ludwigshafen, Deutschland), gelöst in 2 % Triton X-100 (Vol./Vol.) und 0,5 ml 2%iger Brilliantgrün-Lösung in H<sub>2</sub>O. Die Konzentration des Substrats ist von Bedeutung. Falls die Konzentration zu hoch ist, kann sie zu Hintergrundaktivität von Seiten der Hefezellen und/oder von Fadenpilz-Lipasen mit Phospholipase-Nebenaktivität führen.

#### Isolierung eines cDNA-Gens zur Expression in *Aspergillus*:

- Eine Phospholipase-produzierende Hefekolonie wird in 20 ml YPD-Bouillon in einem 50-ml-Glasreagenzröhrchen inokuliert. Das Röhrchen wird 2 Tage lang bei 30° C geschüttelt. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 10 Min. bei 3000 UpM geerntet.

- DNA wird gemäß WO 94/14953 isoliert und in 50 ml Wasser gelöst. Die DNA wird nach Standardverfahren in *E. coli* transformiert. Plasmid-DNA wird aus *E. coli* unter Verwendung von Standardverfahren isoliert und durch Restriktionsenzymanalyse analysiert. Das cDNA-Insert wird mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme ausgeschnitten und in einen *Aspergillus*-Expressionsvektor ligiert.

### Transformation von *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus niger*

Protoplasten können wie in WO 95/02043, S. 16, Zeile 21 - Seite 17, Zeile 12, hier durch die Bezugnahme mit eingeschlossen, beschrieben hergestellt werden.

5

- 100 µl Protoplasten-Suspension werden mit 5-25 µg der geeigneten DNA in 10 µl  
STC (1,2 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) gemischt. Pro-  
toplasten werden mit p3SR2 (ein Plasmid, welches ein *A. nidulans*-amdS-Gen  
trägt) gemischt. Die Mischung wird 25 Minuten lang bei Raumtemperatur belas-  
sen. 0,2 ml 60%iges PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM Tris-  
HCl, pH 7,5, werden zugegeben und sorgfältig gemischt (zweimal) und schließ-  
lich werden 0,85 ml derselben Lösung zugegeben und sorgfältig gemischt. Die  
Mischung wird 25 Minuten lang bei Raumtemperatur belassen, 15 Minuten lang  
bei 2500 g zentrifugiert und das Pellet wird in 2 ml 1,2 M Sorbit resuspendiert.  
15 Nach einer weiteren Sedimentation werden die Protoplasten auf Minimalplatten  
(Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) ausgebreitet, die 1,0 M Sucro-  
se, pH 7,0, 10 mM Acetamid als Stickstoffquelle und 20 mM CsCl zur Hemmung  
des Hintergrundwachstums enthalten. Nach Inkubation für 4-7 Tage bei 37° C  
werden Sporen gepickt und für Einzelkolonien ausgebreitet. Diese Prozedur wird  
20 wiederholt und Spuren einer Einzelkolonie nach der zweiten erneuten Isolierung  
werden als definierte Transformante aufbewahrt.

### Test von *A. oryzae*- oder *Aspergillus niger*-Transformanten

- 25 Jede der *A. oryzae*-Transformanten wird in 10 ml YPM (vgl. unten) inokuliert und  
vermehrt. Nach 2-5 Tagen Inkubation bei 30° C wird der Überstand entfernt. 20  
µl Überstand werden in Löcher eingebracht, die in eine Substratplatte gestochen

wurden (siehe oben). Nach 1-24 Stunden erscheint die Phospholipase-Aktivität als blaugüne Zone um das Loch herum.

#### **Fed-batch-Fermentation**

5

Eine Fed-batch-Fermentation wurde in einem Medium durchgeführt, das Maltodextrin als Kohlenstoffquelle, Harnstoff als Stickstoffquelle und Hefe-extrakt enthielt. Die Fed-batch-Fermentation wurde durchgeführt durch Animpfung einer Schüttelkolbenkultur der fraglichen *A. oryzae*-Wirtszellen in einem Medium, das 3,5 % der Kohlenstoffquelle und 0,5 % der Stickstoffquelle enthält. Nach 24 Stunden Kultivierung bei pH 7,0 und 34° C wurde die kontinuierliche Zufuhr von zusätzlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen initiiert. Die Kohlenstoffquelle wurde als limitierender Faktor verwendet und es wurde sichergestellt, daß Sauerstoff in Überschußmengen vorhanden war. Die Fed-batch-Kultivierung wurde 4 Tage lang fortgesetzt.

10  
15

#### **Isolierung der in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz**

Der für Phospholipase kodierende Abschnitt der in SEQ-ID-Nr. 1 dargestellten DNA-Sequenz, kodierend für die Phospholipase der Erfindung, kann aus dem hinterlegten Organismus *Escherichia coli* DSM 11299 durch Extraktion von Plasmid-DNA nach im Stand der Technik bekannten Verfahren erhalten werden (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).

20  
25

**Medien**

YPD: 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, H<sub>2</sub>O auf 900 ml; autoklaviert, 100 ml 20%iger Glucose (steril filtriert) zugegeben.

5

YPM: 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, H<sub>2</sub>O auf 900 ml; autoklaviert, 100 ml 20%iges Maltodextrin (steril filtriert) zugegeben.

10 x Grundsatz: 75 g Hefe-Stickstoff-Base, 113 g Succinsäure, 68 g NaOH, H<sub>2</sub>O auf 1000 ml, steril filtriert.

15

SC-URA: 100 ml 10 x Grundsatz, 28 ml 20%iger Casamino-säuren ohne Vitamine, 10 ml 1%iges Tryptophan, H<sub>2</sub>O auf 900 ml, autoklaviert, 3,6 ml 5%iges Threonin und 100 ml 20%ige Glucose oder 20%ige Galactose zugegeben.

SC-Agar: SC-URA, 20 g/l Agar zugegeben.

SC-Agarvariante: 20 g Agar, 20 ml 10 x Grundsatz, H<sub>2</sub>O auf 900 ml, autoklaviert.

20 PEG 4000 (Polyethylenglycol, Molekulargewicht = 4.000) (BDH, England).

**BEISPIELE**

25

## BEISPIEL 1

Fermentation von *Fusarium oxysporum*-Phospholipase

- 5 Eine Kultur von *Fusarium oxysporum*, DSM 2672, auf einem Agarausstrich wurde in fünf 500-ml-Schüttelkolben überführt, jeweils mit 100 ml Bouillon-3-Medium, und bei 30° C einen Tag lang geschüttelt (200 UpM, Amplitude 2,5 cm).

Die Zusammensetzung des Bouillon-3-Mediums war wie folgt:

Pepton	6	g/l
Trypsin-verdautes Casein	4	g/l
Hefeextrakt	3	g/l
Fleischextrakt	1,5	g/l
Glucose	1	g/l

10

Das Medium wurde 40 Minuten lang bei 121° C autoklaviert.

- Die Kulturbouillon dieser Bouillon-3-Schüttelkolben wurde als Impfkultur zur  
 15 Animpfung von 20 500-ml-Schüttelkolben, jeweils mit 200 ml PL-1-Medium, verwendet.

Die Zusammensetzung des PL-1-Mediums war wie folgt:

Pepton	10	g/l
Tween®-80	12	g/l

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
pH-Wert vor dem Autoklavieren	6,0

Das Medium wurde 40 Minuten lang bei 121° C autoklaviert.

- 5 Jeder PL-1-Schüttelkolben wurde mit 0,5-2 ml Bouillon-3-Kulturbouillon angeimpft und bei 200 UpM (Amplitude 2,5 cm) 5 Tage lang bei 30° C geschüttelt. Die Kulturbouillon aus den Schüttelkolben wurde bei der Ernte vereinigt, insgesamt 3,9 l mit einer Enzymausbeute von 53 LE/ml.

10

## BEISPIEL 2

### Reinigung von Phospholipase

- Schritt 1) Der Überstand einer Ein-Liter-Fermentation wurde zentrifugiert und  
15 das resultierende Präzipitat verworfen. Der Überstand wurde dann durch Zugabe von festem Ammoniumacetat auf 0,8 M Ammoniumacetat eingestellt.

- Schritt 2) - Hydrophobe Chromatographie - Eine Toyopearl-Butyl-650 C-Matrix wurde von Toso Hass (Firma Röhm und Haas, Deutschland) bezogen. Ei-  
20 ne 50-ml-Säule wurde mit der Matrix gepackt. Die Säule wurde mit 50 %igem Ethanol und anschließend mit Wasser gewaschen. Die Säule wurde dann mit 0,8 M Ammoniumacetat äquilibriert. Der Fermentationsüberstand, mit 0,8 M Ammoniumacetat eingestellt, wurde dann auf die Säule aufgetragen. Ungebundenes Material wurde dann mit 0,8 M Ammoniumacetat gewaschen, bis das gesamte  
25 UV-absorbierende Material (280 nm) entfernt war.

Die Säule wurde dann mit Wasser und anschließend mit 50%igem Ethanol eluiert.

Die Phospholipase-Aktivität wurde bei pH 4,5 und 40° C unter Verwendung des  
5 NEFA-Kits wie oben beschrieben bestimmt. Fraktionen, die Aktivität in Wasser  
und Alkohol-Eluat enthielten, wurden vereinigt. Die Aktivität wurde bei pH 4,5  
unter Verwendung des NEFA-Kit-Assays nachgewiesen.

Fraktionen, die Phospholipase-Aktivität enthielten, wurden dann vereinigt und  
10 unter Verwendung einer Amicon-Ultrafiltrationsmembran mit einem Ausschluß  
von 10 kD dialysiert und konzentriert.

### Schritt 3) Negative Absorption bei DEAE FF („Fast Flow“)-Chromatographie

15 DEAE FF wurde von Pharmacia bezogen und eine 50-ml-Säule wurde mit der  
Matrix gepackt.

Die Säule wurde dann wie vom Hersteller beschrieben gewaschen und mit 25 mM  
Tris-Acetat-Puffer, pH 7, äquilibriert.

20

Die dialysierte und konzentrierte Probe wurde dann auf pH 7 und eine Leitfähig-  
keit von 2 mSi. eingestellt und auf eine DEAE FF-Anionenaustauscher-Säule auf-  
getragen.

25 Die Aktivität wurde als Ausfluß gesammelt. Die Aktivität bindet bei pH 7 nicht an  
den Anionenaustauscher.



Der Aktivität enthaltende Ausfluß von der DEAE FF wurde mit Hilfe einer Amicon-Membran mit einem Ausschluß von 10 kD und einem Puffer von 25 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6, konzentriert und dialysiert.

5

#### *Gelfiltration auf Superdex 75*

Eine mit Superdex 75 vorgepackte Hiload Tm 16/60-Säule von Pharmacia wurde gewaschen und mit 25 mM Natriumacetat, pH 6, enthaltend 150 mM NaCl, äquilibriert.

10

2 ml des konzentrierten Ausflusses von dem Anionenaustauscher, der Phospholipase-Aktivität bei pH 4,5 und 40° zeigte, wurde auf die Superdex-Säule aufgetragen.

15

Die Aktivität wurde durch Gelfiltration mit einer Durchflußrate von 1 ml/Minute abgetrennt.

#### BEISPIEL 3

20 **Charakterisierung von gereinigter Phospholipase, die aus *Fusarium oxysporum* erhalten wurde**

Eine Charakterisierung wie im folgenden beschrieben wurde mit einer *Fusarium oxysporum*-Phospholipase durchgeführt, die wie in Beispiel 1 beschrieben fermentiert und wie in Beispiel 2 beschrieben gereinigt worden war.

25

Das Molekulargewicht des Phospholipase-Enzyms wurde unter Verwendung von vorgegossenen 4 bis 20 %igen SDS-PAGE-Platten von Novex Tm bestimmt. Das Molekulargewicht des Proteins wurde unter reduzierenden Bedingungen wie bereits beschrieben bestimmt.

5

Für die *F. oxysporum*-Phospholipase wurde das Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen als 29-30 kD befunden.

Der isoelektrische Punkt wurde unter Verwendung von Ampholine-PAGE-Platten von Pharmacia bestimmt.

10

Für das *F. oxysporum* wurde der pI-Wert des Proteins bei etwa neutralem pH, vorzugsweise im Bereich von 5,8 bis 6,8, befunden.

15 Thermostabilität der Phospholipase

Die Thermostabilität der Phospholipase aus *Fusarium oxysporum* wurde mittels DSC (Differentialscanningkalorimetrie) getestet. Die thermische Denaturierungstemperatur, Td, wurde als Gipfel des Denaturierungspeaks in Thermogrammen (Cp gegen T) genommen, welche nach Erwärmung von Enzymlösungen mit einer konstanten programmierten Erwärmungsrate erhalten worden waren.

20

25

Experimentelles:

Eine DSC II von Hart Scientific (Utah, US, 1993) wurde für die Experimente eingesetzt.

5

50 mM gepufferte Lösungen wurden als Lösungsmittel für das Enzym (etwa 2 mg/ml) bei entweder pH 10 (50 mM Glycin-Puffer), pH 7 (50 mM HEPES-Puffer + 10 mM EDTA) oder pH 4 (50 mM Citrat-Puffer) eingesetzt. Das Enzym wurde gemäß Beispiel 2 oben gereinigt.

10

750 µl Enzymlösung wurden in verschließbare 1-ml-Standard-Hastelloy-Ampullen von Hart Scientific überführt. Die Ampullen wurden in den Kalorimeter eingebracht und 15 Minuten lang auf 5° C gekühlt. Die thermische Äquilibration wurde vor dem DSC-Scan durchgeführt. Der DSC-Scan wurde von 5° C bis 15 95° C mit einer Scan-Rate von etwa 90 K/h durchgeführt. Die Denaturierungstemperaturen wurden mit einer Genauigkeit von etwa +/- 2° C bestimmt.

Ergebnisse:

20 Tabelle Nr. 1: Gipfel des Denaturierungspeaks als Funktion des pH-Werts

pH	Td (°C)
4	57° C
7	62° C
10	55° C

Es sollte angemerkt werden, daß diese Experimente in Abwesenheit einer Ölmatrix, welche die Enzymstabilität signifikant beeinflussen kann, durchgeführt wurden. Die DSC-Ergebnisse zeigen eine maximale Stabilität in der Nähe von neutralem pH-Wert an.

5

Unter der Annahme einer irreversiblen thermischen Denaturierung beträgt eine relevante Performance-Temperatur in einer industriellen Anwendung, wie z.B. der Degummierung von Ölen (US 5,264,367), mindestens etwa 10° weniger als die in Tabelle Nr. 1 oben aufgelisteten Td-Temperaturen.

10

#### Aminoterminal Sequenz

Eine aminoterminal Analyse wurde unter Anwendung des Edman-Abbaus mit einer Applied Biosystem-Apparatur (ABI 473A Proteinsequenzierer, Applied Biosystem, USA) durchgeführt wie vom Hersteller beschrieben.

15

N-terminale Sequenz(en):

Für die *F. oxysporum*-Phospholipase ist die N-terminale Sequenz:

20

N-Terminus A-V-G-V-T-T-T-D-F-S-N-F-K-F-Y-I

Die N-terminale Aminosäure "A" (Ala) ist Position 31 in SEQ-ID-Nr. 2. Dies zeigt an, daß das reife Phospholipase-Enzym der Erfindung bei Position 31 in SEQ-ID-Nr. 2 beginnt.

25

Folglich ist die reife Sequenz von 31-346 in SEQ-ID-Nr. 2.

**BEISPIEL 4****Phospholipase A-Aktivität**

- 5 Die Phospholipase A-Aktivität wurde mit Sojabohnen-Lecithin als Substrat wie oben beschrieben (Assay auf Grundlage des NEFA-Tests) bei pH 4,5 und 40° C bestimmt.

- Die *F. oxysporum*-Phospholipase zeigte eine signifikante Phospholipase A-  
10 Aktivität unter den oben beschriebenen Bedingungen.

**BEISPIEL 5****Aktivität gegenüber L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin**

15

Die Phospholipase-Aktivität wurde mit L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin als Substrat wie oben beschrieben (Assay auf Grundlage des NEFA-Tests) bei pH 4,5 und 40° C bestimmt.

- 20 Die *F. oxysporum*-Phospholipase zeigte eine signifikante Aktivität gegenüber L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin unter den oben beschriebenen Bedingungen.

## BEISPIEL 6

## Phospholipase-Aktivität in einer Monoschicht-Anordnung

- 5 Eine Monoschicht-Apparatur (Trog nullter Ordnung, KSV5000, KSV Instruments, Finnland) wurde eingesetzt, um die Aktivität verschiedener Enzyme gegenüber dem Phospholipid DDPC (Di-decanoyl (C10) phosphatidylcholin) zu beurteilen.

10 Experimente

- Auf eine sorgfältig gereinigte Oberfläche einer Pufferlösung (10 mM TRIS, pH 8,0, 25° C) wurde eine Monoschicht von DDPC aus einer Chloroform-Lösung ausgebreitet. Nach Relaxation der Monoschicht (Verdampfung von Chloroform)
- 15 wird der Oberflächendruck auf 15 mN/m, entsprechend einer mittleren Molekülfläche von DDPC von etwa  $63 \text{ \AA}^2/\text{Molek.}$ , eingestellt. Eine Pufferlösung (siehe oben), enthaltend etwa 60  $\mu\text{g}$  (Mikrogramm) Enzym, wird durch die Monoschicht in die untere Phase der Reaktionskammer (Zylinder mit einer Fläche von 1520  $\text{mm}^2$  und einem Volumen von 30400  $\text{mm}^3$ ) in dem "Trog nullter Ordnung" gespritzt.
- 20 Die enzymatische Aktivität manifestiert sich durch die Geschwindigkeit einer mobilen Barriere, welche die Monoschicht zusammendrückt, um einen konstanten Oberflächendruck aufrechtzuerhalten, während unlösliche Substratmoleküle zu stärker wasserlöslichen Reaktionsprodukten hydrolysiert werden. Nachdem verifiziert wurde, daß die Wasserlöslichkeit der Reaktionsprodukte (Caprinsäure und DDPC) beträchtlich höher ist als für DDPC, wird die Anzahl der pro
- 25 Minute von dem Enzym hydrolysierten DDPC-Moleküle anhand der mittleren Molekülfläche (MMF) von DDPC abgeschätzt.

Ergebnisse

Tabelle 2: Aktivität von Enzymen gegenüber DDPC in einer Monoschicht-Anordnung

Enzym	Aktivität (nMol/Min.) *)
Sigma P9279 (PLA2 aus Bienengift, 850 E/mg)	1,9
Enzym aus <i>Fusarium oxysporum</i>	2,7
<i>Candida antarctica</i> -Komponente B-Lipase	0
<i>Candida antarctica</i> -Komponente A-Lipase	0
Rekombinante Meerschweinchenpankreas-Lipase (rGPL)	0,2
Lipolase® (Novo Nordisk A/S)	< 0,1

- 5 \*)Berechnet anhand der Verringerung der Monoschichtfläche pro Zeiteinheit, welche durch die Anwesenheit von Enzym induziert wird.

"Enzym aus *F. oxysporum*" in Tabelle 2 ist eine Phospholipase der Erfindung, gereinigt wie in Beispiel 2 beschrieben.

10 Schlußfolgerung

Für die meisten Enzyme wurde keine Phospholipase-Aktivität nachgewiesen, mit Ausnahme von aus Meerschweinchen-Lipase erhaltenen Lipasen, welche eine geringe Phospholipase-Aktivität zeigten.

15

Die Phospholipase der Erfindung, erhalten aus *Fusarium oxysporum*, zeigte eine überraschend hohe signifikante Phospholipase-Aktivität.

Folglich ist in der vorliegenden Erfindung der hier in Verbindung mit einer Phospholipase der Erfindung gebrauchte Begriff "Phospholipase-Aktivität" definiert als eine Aktivität, welche in dem oben dargestellten "Monoschicht-Phospholipase-Assay" mindestens 0,25 nMol/Min., Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 0,40 nMol/Min., Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 0,75 nMol/Min., Enzymdosis: 60 µg; bevorzugter mindestens 1,0 nMol/Min., Enzymdosis: 60 µg, bevorzugter mindestens 1,25 nMol/Min., Enzymdosis: 60 µg, und noch bevorzugter mindestens 1,5 nMol/Min., Enzymdosis: 60 µg, beträgt.

10 Der Begriff "Lipase mit Phospholipase-Nebenaktivität" ist dementsprechend als eine Lipase mit einer Phospholipase-Nebenaktivität definiert, wobei die Phospholipase-Nebenaktivität in dem in Beispiel 6 dargestellten "Monoschicht-Phospholipase-Assay" niedriger ist als die oben angegebenen Zahlen bezüglich Phospholipase-Aktivität.

15 Ein Beispiel einer Lipase mit Phospholipase-Nebenaktivität gemäß den hier gegebenen Definitionen ist die in Tabelle 2 oben angegebene Meerschweinchen-Lipase. Diese Meerschweinchen-Lipase besitzt eine Phospholipase-Nebenaktivität in dem "Monoschicht-Phospholipase-Assay", welche niedriger als 0,25  
20 nMol/Min., Enzymdosis: 60 µg, ist.

## BEISPIEL 7

Klonierung und Expression einer Phospholipase aus *Fusarium oxysporum*  
25 DSM Nr. 2672

Die Klonierung und Expression erfolgten durch Anwendung der Technik der Expressionsklonierung in Hefe wie oben beschrieben.



mRNA wurde aus *Fusarium oxysporum*, DSM Nr. 2672, isoliert, das wie oben beschrieben, einschließlich mechanischer Bewegung, um eine ausreichende Belüftung sicherzustellen, gezüchtet worden war. Myzelien wurden nach 3-5 Tagen  
5 Wachstum geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80° C gelagert. Eine Bank von *Fusarium oxysporum*, DSM Nr. 2672, bestehend aus etwa  $9 \times 10^5$  individuellen Klonen, wurde in *E. coli* erstellt wie beschrieben, mit einem Vektorhintergrund von 1 %. Plasmid-DNA aus einigen der Pools wurde in Hefe transformiert und 50-100 Platten, enthaltend 250-400 Hefekolonien, wurden  
10 aus jedem Pool erhalten.

Phospholipase-positive Kolonien wurden identifiziert und auf Substratplatten isoliert (siehe oben). cDNA-Inserts wurden direkt von den Hefekolonien amplifiziert und charakterisiert wie im Abschnitt "Materialien und Methoden" oben beschrieben. Die DNA-Sequenz der cDNA, welche für die Phospholipase kodiert, ist in  
15 SEQ-ID-Nr. 1 dargestellt und die entsprechende Aminosäure-sequenz ist in SEQ-ID-Nr. 2 dargestellt. In SEQ-ID-Nr. 1 definieren die DNA-Nukleotide von Nr. 23 bis Nr. 1060 den für Phospholipase kodierenden Bereich. Der Abschnitt der DNA-Sequenz in SEQ-ID-Nr. 1, welcher für den reifen Teil der Phospholipase  
20 kodiert, umfaßt die Positionen 113 bis 1060, welche den Aminosäurepositionen 31-346 in SEQ-ID-Nr. 2 entsprechen.

Die cDNA ist aus dem Plasmid in DSM 11299 erhältlich.

25 Gesamt-DNA wurde aus einer Hefekolonie isoliert und Plasmid-DNA wurde durch Transformation von *E. coli* wie oben beschrieben gewonnen. Zur Expression der Phospholipase in *Aspergillus* wurde die DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, auf Gel größenfraktioniert und ein Fragment, das dem Phospholipase-Gen entsprach, wurde gereinigt. Das Gen wurde anschließend mit

pHD414 ligiert, mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, was das Plasmid pA2PH10 ergab.

Nach Amplifizierung der DNA in *E. coli* wurde das Plasmid wie oben beschrieben in *Aspergillus oryzae* transformiert.

#### Test von *A. oryzae*-Transformanten

Jede der Transformanten wurde hinsichtlich Enzymaktivität wie oben beschrieben getestet. Einige der Transformanten besaßen eine Phospholipase-Aktivität, welche signifikant höher als der *Aspergillus oryzae*-Hintergrund war. Dies demonstriert eine effiziente Expression der Phospholipase in *Aspergillus oryzae*.

### BEISPIEL 8

#### Rekombinante Expression einer *F. oxysporum*-Phospholipase

Eine *A. oryzae*-Transformante, umfassend den *Aspergillus*-Expressionsvektor pA2PH10 (siehe Beispiel 7), wurde Fed-batch-fermentiert wie oben beschrieben. Die Reinigung der rekombinant hergestellten *F. oxysporum*-Phospholipase wurde wie im Beispiel 2 beschrieben durchgeführt.

### BEISPIEL 9

**Charakterisierung einer rekombinant exprimierten und gereinigten Phospholipase, erhalten aus *Fusarium oxysporum***

Die Charakterisierung wurde mit einer rekombinant exprimierten und anschließend gereinigten *Fusarium oxysporum*-Phospholipase (siehe Beispiel 8) durchgeführt.

Diese Charakterisierungsergebnisse bezüglich der rekombinanten *F. oxysporum*-Phospholipase der Erfindung korrelierten perfekt mit den in Beispiel 3 dargestellten Charakterisierungsergebnissen, wo demonstriert wurde, daß das rekombinant exprimierte und gereinigte Enzym das gleiche war, wie die nicht-rekombinant exprimierte und gereinigte Phospholipase, die im Beispiel 3 charakterisiert worden war.

Allgemeine Assays, die zur Charakterisierung einer rekombinant hergestellten Phospholipase, erhalten aus *F. oxysporum*, eingesetzt wurden

Phospholipase-Assays:

Phospholipase-Aktivität (PHLE) wurde als Freisetzung freier Fettsäuren aus Lecithin gemessen. 50 µl 4%iges L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (Pflanzenlecithin von Avanti, USA), 4 %iges Triton X-100, 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 50 mM HEPES, pH 7, wurden zugegeben, 50 µl Enzymlösung auf eine geeignete Konzentration in 50 mM HEPES, pH 7, verdünnt. Die Proben wurden 10 Minuten lang bei 30° C inkubiert und die Reaktion bei 95° C 5 Minuten lang vor der Zentrifugation (5 Min. bei 7000 UpM) gestoppt. Freie Fettsäuren wurden mit Hilfe des NEFA C-Kits von Wako Chemicals GmbH bestimmt; 25 µl Reaktionsmischung wurden zu 250 µl

Reagens A zugegeben und 10 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Dann wurden 500 µl Reagens B zugegeben und die Probe erneut 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Extinktion bei 550 nm wurde mit Hilfe eines HP 8452A-Diodenarray-Spektralphotometers gemessen. Proben wurden mindestens in Doppelbestimmungen laufen gelassen. Substrat- und Enzymblindproben (vorgewärmte Enzymproben (10 Min. bei 95° C) + Substrat) waren eingeschlossen. Ölsäure wurde als Fettsäure-Standard verwendet. 1 PHLE entspricht derjenigen Menge an Enzym, welche in der Lage ist, 1 µMol freier Fettsäure/Min. unter diesen Bedingungen freizusetzen.

10

Alternativ wurde der Assay bei 37° C in 20 mM Citratpuffer, pH 5, (Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit) oder 20 mM Britton-Robinson-Puffer (pH-Profil/Temperaturprofil/Stabilität) gefahren.

15 Phospholipase A1-Aktivität (PLA1) wurde unter Verwendung von 1-(S-Decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin (D3761 Molecular Probes) als Substrat gemessen. 190 µl Substrat (100 µl D3761 (2 mg/ml in Ethanol) + 50 µl 1 %iges Triton X-100 + 1,85 ml 50 mM HEPES, 0,3 mM DTNB, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7) in einer 200-µl-Küvette wurden zu 10 µl Enzym zugegeben und  
20 die Extinktion bei 410 nm wurde als Funktion der Zeit mit dem HP 8452A-Diodenarray-Spektralphotometer bei Raumtemperatur gemessen. Die Aktivität wurde als Steigung der Kurve im linearen Bereich berechnet. PLA1 entspricht derjenigen Menge an Enzym, welche in der Lage ist, 1 µMol freier Fettsäure (Thiol)/Min. unter diesen Bedingungen freizusetzen.

25

Phospholipase A2-Aktivität (PLA2) wurde bei 40° C unter Verwendung von 1-Hexadecanoyl-2-(1-pyrendecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin (H361, Molecular Probes) gemessen. 2 ml Substrat (50 µl 1 %iges Triton X-100 + 25 µl 0,1%iges H361 in Methanol + 10 ml 50 mM HEPES, pH 7) in einer 2-ml-Küvette  
30 wurden unter Rühren zu 10 µl Enzym zugegeben und die Pyren-

Fluoreszenzemission bei 376 nm (Anregung bei 340 nm) wurde als Funktion der Zeit (Intervalle von 1 Sekunde) unter Verwendung des Perkin Elmer LS50-Geräts gemessen. Bei den Triton X-100/Phospholipid-Mizellen wurde die Konzentration an Phospholipid so eingestellt, um eine Exzimer-Bildung zu erhalten (emittiert bei 5 480 nm). Nach der Spaltung wird die Fettsäure in der 2-Position, welche die Pyrengruppe enthält, in die wäßrige Phase freigesetzt, was zu einer Erhöhung der Monomer-Emission führt. PLA2 wurde als Steigung der Kurve im linearen Bereich unter gleichen Bedingungen genommen.

#### 10 Lipase-Assays:

Lipase-Aktivität (LE) wurde gemäß der Novo Nordisk-Publikation AF 95 gemessen. Die Hydrolyse von Tributyrin bei 30° C und pH 7 wurde in einem pH-Stat-Titrationsexperiment verfolgt. 1 LE entspricht derjenigen Menge an Enzym, welche in der Lage ist, 1 µMol Buttersäure/Min. unter Standardbedingungen freizusetzen. 15

Die Aktivität gegenüber Olivenöl (SLE) wurde wie folgt gemessen: 12 ml 5 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9, wurden zu 2,5 ml Sigma-Lipase-Substrat zugegeben. Der pH-Wert wurde auf pH 9 oder knapp darunter eingestellt, 20 bevor 0,5 ml Lipase-Lösung (verdünnt in Puffer) zugegeben wurden und ein pH-Stat-Titrationsassay bei 30° C unter Verwendung des Titalab, von Radiometer A/S, Kopenhagen, Dänemark, im Handel erhältlich, gefahren wurde. 1 SLE entspricht derjenigen Menge an Enzym, welche in der Lage ist, 1 µMol freier Fettsäure/Min. bei pH 9, 30° C, freizusetzen. 25

Charakterisierung einer rekombinant hergestellten *F. oxysporum*-Phospholipase der Erfindung

Die zur Charakterisierung der im folgenden genannten Enzyme verwendeten Assays waren die unmittelbar oben beschriebenen Assays.

5 Enzyme:

PL aus *Fusarium oxysporum* mit der in SEQ-ID-Nr. 2 dargestellten Aminosäuresequenz

10 Charge F-9700989, OD<sub>280</sub> 0,83 (0,69 mg/ml), Reinheit > 95 % (SDS-PAGE)

Das Enzym wurde wie oben beschrieben rekombinant exprimiert und gereinigt.

Lecitase<sup>TM</sup>, Charge L546-F06 (10368 IE/ml, etwa 20 mg/ml)

15

Lipolase<sup>®</sup> (Novo Nordisk A/S)

Der Einfluß von Ca<sup>2+</sup> auf die Phospholipase-Aktivität der *F. oxysporum*-Lipase/Phospholipase wurde untersucht. Es wurde kein größerer Unterschied festgestellt, unabhängig davon, ob EDTA oder Ca<sup>2+</sup> in dem Assay eingeschlossen war oder nicht (siehe Tabelle 3 unten), und somit scheint das Enzym relativ unabhängig von Ca<sup>2+</sup> zu sein.

20

Tabelle 3

25

Abhängigkeit der *F. oxysporum*-Phospholipase-Aktivität (PHLE) von EDTA und  $\text{CaCl}_2$  - 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Citrat, pH 5 bei 37° C

	5 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM $\text{CaCl}_2$	2 mM $\text{CaCl}_2$	5 mM $\text{CaCl}_2$	10 mM $\text{CaCl}_2$
Relative Aktivität <sup>1</sup>	1,05	1,10	1	0,90	0,90	0,89

5

<sup>1</sup>Die relative Aktivität ist auf die Aktivität bei 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bezogen, welche auf 1 normalisiert ist.

Das pH-Profil wurde in Britton-Robinson-Puffer unter Verwendung von Pflanzenlecithin als Substrat untersucht (Tabelle 4). Obwohl das Enzym mit Phospholipid ein alkalisches pH-Profil mit einem Optimum bei pH 9 oder höher zeigt, ist die Aktivität immer noch ausreichend hoch, um die Degummierung von Ölen bei niedrigem pH-Wert und die Performance beim Backen zu gewährleisten (hinsichtlich eines Vergleichs der spezifischen Aktivitäten siehe unten).

15

Tabelle 4

pH-Profil der *Fusarium oxysporum*-Phospholipase, 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR, 37° C

20

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Relative Aktivität <sup>1</sup>	0,08	0,12	0,16	0,28	0,52	0,76	1,00

<sup>1</sup> Die relative Aktivität ist auf die Aktivität bei pH 9 bezogen, welche auf 1 normalisiert ist.

- 5 Temperaturprofile für die Phospholipase wurden bei pH 5 erhalten; die Aktivität beginnt bei Temperaturen oberhalb von 40° C abzufallen (Tabelle 5). Dies ist in vernünftiger Übereinstimmung mit der Temperaturstabilität, welche durch Vorinkubation des Enzyms und anschließende Messung der Restaktivität gemessen wird (Tabelle 6), wobei das Enzym bei Temperaturen bis zu 45° C bei pH 5 stabil ist.

Tabelle 5

- 15 Temperaturprofil der *F. oxysporum*-Phospholipase, 2 % Lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR

	30° C	40° C	45° C	50° C	55° C
pH 5	0,85	1,00	0,67	0,38	0,13

- 20 Alle Daten sind als relative Aktivitätsdaten, bezogen auf die Aktivität bei pH 5, 40° C, welche auf 1 normalisiert ist, dargestellt.

Tabelle 6

- 25 Temperaturstabilität der *F. oxysporum*-Phospholipase; 30 Minuten Vorinkubation in 20 mM BR



	5° C	30° C	40° C	45° C	50° C	55° C
pH 5	1,00	0,91	1,03	1,07	0,65	0,00

Alle Daten sind als Restaktivitätsdaten dargestellt, wobei die Aktivität nach Vorinkubation bei 5° C auf 1 normalisiert ist.

Die niedrige Stabilität des Enzyms kann vorteilhaft sein, um ein eventuelles Produkt als Verfahrenshilfsstoff zu registrieren, da das aktive Enzym weder bei der Degummierung von Speiseölen noch bei Backprodukten im Endprodukt erwartet werden sollte.

Die aus *Fusarium oxysporum* erhaltene Phospholipase der Erfindung besitzt sowohl Phospholipase- als auch Lipase-Aktivität.

Dementsprechend wurde die Aktivität des Enzyms gegenüber verschiedenen Lipase- und Phospholipase-Substraten untersucht und mit der Aktivität der im Handel erhältlichen Phospholipase Lecitase<sup>TM</sup> und der im Handel erhältlichen Lipase Lipolase<sup>®</sup> (Novo Nordisk A/S) verglichen.

Die *F. oxysporum*-Phospholipase/Lipase besitzt hohe Aktivität sowohl gegenüber Tributyrin als auch Olivenöl bei pH 7 und 9 (Tabelle 7). Für Vergleichszwecke liegt die spezifische Aktivität von Lipolase<sup>®</sup> bei etwa 5000 LE/mg. Jedoch zeigt die *F. oxysporum*-Lipase im Gegensatz zur Lipolase<sup>®</sup> eine viel breitere Spezifität mit beträchtlicher Phospholipase-Aktivität und auch Thioesterase-Aktivität (siehe Monoschicht-Beispiel 6 oben, welches zeigt, daß Lipolase<sup>®</sup> keine messbare Phospholipase-Aktivität besitzt).

Die *F. oxysporum*-Phospholipase/Lipase der Erfindung besitzt eine spezifische Aktivität gegenüber Lecithin, die beträchtlich höher liegt als diejenige der Phospholipase Lecitase<sup>TM</sup> (Schweinepankreas-PLA2) bei pH 7 (Tabelle 7).

5

Im Vergleich zu Lecitase<sup>TM</sup> besitzt das *F. oxysporum*-Enzym eine 100fach höhere Aktivität bei pH 7. Das Phospholipase:Lipase-Verhältnis für das *F. oxysporum*-Enzym liegt um 0,225 (1000 LE/mg / 225 PHLE/mg) unter ähnlichen Bedingungen (pH 7 und 30 °C).

10

Tabelle 7

Aktivität der *F. oxysporum*-Lipase/Phospholipase – Vergleich mit Lecitase<sup>TM</sup>

Enzym	LE/mg	PLE <sup>1</sup> /mg	PHLE/mg	SLE/mg	PLA <sup>1</sup> /mg
<i>F. oxysporum</i>	1000	73	225	3090	2,04
Lecitase	< 0,25	2,5	1,2-3,2	0,6	0

15

<sup>1</sup>PLE wurde wie PHLE gemessen, jedoch in 20 mM Citrat, pH 5, und bei 37 °C anstelle von 50 mM HEPES, pH 7, bei 30 °C.

- 20 Die Spezifität der *F. oxysporum*-Lipase/Phospholipase wurde mit Hilfe von Substraten untersucht, die für Phospholipase A1 spezifisch sind; Messung der Spaltung der Thioester-Verknüpfung in der 1-Position von 1-(S-Decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**